

**BESONDERHEITEN DER DNA-ERKENNUNG UND SPALTUNG
DURCH DIE RESTRIKTIONSENDONUKLEASE *EcoRII***

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

angefertigt am Institut für Virologie der Charité
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Diplomchemikerin Merlind Mücke
geboren am 15. Januar 1972 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Rainer Borriß
2. Prof. Dr. Detlev H. Krüger
3. Prof. Dr. Walter Messer

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Oktober 2002

Abstrakt

Die homodimere Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* erfordert im Gegensatz zu den orthodoxen Typ II Restriktionsendonukleasen die simultane Wechselwirkung mit zwei Kopien ihrer DNA-Erkennungssequenz 5'CCWGG, um die spezifische endonukleolytische Spaltung der DNA zu katalysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie bewiesen, daß *EcoRII* die Bildung von DNA-Schleifen an einem linearen DNA-Substrat mit zwei DNA-Erkennungsorten induziert - ähnlich wie andere DNA prozessierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Kinetische Untersuchungen der DNA-Spaltreaktion von *EcoRII* mit superhelikaler Plasmid-DNA, die entweder einen oder zwei DNA-Erkennungsorte für *EcoRII* enthielt, zeigten, daß *EcoRII* pro Spaltereignis nur an einem der beiden involvierten doppelsträngigen DNA-Erkennungsorte spaltet. Die Studie, in der *EcoRII* photochemisch mit den Basen der DNA-Erkennungssequenz vernetzt wurde, ergab ein asymmetrisches Vernetzungsmuster, das durch die partielle Asymmetrie an der A/T-Position der ansonsten palindromischen Erkennungssequenz hervorgerufen wird. Wir konnten zeigen, daß die Aminosäure Tyr⁴¹ von *EcoRII* das 5'C des 5'CCAGG-Stranges der Erkennungssequenz kontaktiert. Durch Aufklärung der Domänenorganisation von *EcoRII* konnten wir das Modell der *EcoRII*-DNA-Interaktion verbessern. Wir zeigten, daß für die simultane Interaktion des Enzyms *EcoRII* mit zwei Kopien der Erkennungssequenz zwei verschiedene Domänen verantwortlich sind. Die C-terminale Domäne ist eine neue Restriktionsendonuklease, die effizienter als das vollständige *EcoRII* an einzelnen Erkennungsorten spaltet. Die N-terminale Domäne bindet spezifisch an die DNA und reduziert die Aktivität des vollständigen Enzyms, indem sie die Spaltung von einem zweiten Erkennungsort abhängig macht. Daher nehmen wir an, daß *EcoRII* in der Evolution in Form der N-terminalen Domäne eine zusätzliche DNA-Bindungsfunktion akquiriert hat, um eine neue Proteinfunktion zu entwickeln, die die Spaltung von DNA und die Interaktion mit zwei DNA-Erkennungsorten einschließt. Solche Interaktionen sind z.B. Voraussetzung für die DNA-Rekombination oder Transposition. Daher könnte die gegenwärtige *EcoRII* Restriktionsendonuklease eine evolutionärer Übergang von ortsspezifischen Endonukleasen zu einem neuen Protein sein, das spezifisch mit zwei DNA-Orten interagiert.

DNA Restriktion, *EcoRII* Restriktionsendonuklease, *EcoRII* Evolution, DNA-Protein-Interaktion

Abstract

The homodimeric type IIE restriction endonuclease *EcoRII* requires the cooperative interaction with two copies of the recognition sequence 5'CCWGG for DNA cleavage. This is in contrast to the orthodox type II restriction endonucleases which interact with single recognition sequences. We have proven by transmission electron microscopy that *EcoRII* simultaneously binds two recognition sites on a linear DNA-substrate by looping out the intervening DNA. This DNA-loop formation is similar to that of other DNA processing enzymes and transcription factors. Kinetic investigations of the DNA cleavage of supercoiled DNA-plasmids containing either one or two recognition sites for *EcoRII* showed that *EcoRII* cleaves only at one of the two involved double-stranded DNA recognition sites. Photocross-linking of *EcoRII* to the bases of the recognition sequence revealed an asymmetric cross-linking pattern. This asymmetry is due to the partial asymmetry of the recognition sequence at the central A/T position. Furthermore, we found that amino acid Tyr⁴¹ of *EcoRII* specifically contacts the 5'C of the 5'CCAGG strand of the recognition sequence. We found by limited proteolysis that a two-domain structure enables *EcoRII* to interact cooperatively with two recognition sites. The C-terminal domain is a new restriction endonuclease that, in contrast to the complete *EcoRII*, specifically cleaves at single 5'CCWGG recognition sites. Moreover, this new restriction endonuclease cleaves much more efficiently than *EcoRII*. The N-terminal domain specifically binds the DNA-substrate and reduces the activity of *EcoRII* by making the enzyme dependent on a second recognition site. Therefore, we assume that a precursor *EcoRII* enzyme acquired another DNA binding domain to develop a new protein function that includes DNA cleavage and specific interaction with two DNA sites. The current *EcoRII* protein could be an evolutionary intermediate between a site-specific endonuclease and a protein that functions specifically with two DNA sites such as DNA recombinases and transposases.

DNA restriction, *EcoRII* restriction endonuclease, *EcoRII* evolution, DNA-protein interaction

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	Restriktionsendonukleasen – ihr Vorkommen, ihre Funktion und Bedeutung	8
1.2	Subtypen der Typ II Restriktionsendonukleasen	10
1.3	Kristallstrukturen von Restriktionsendonukleasen und ihre evolutionäre Verwandtschaft mit anderen Enzymen	11
1.4	Wechselwirkung der Restriktionsendonukleasen mit der DNA	14
1.5	Kooperative DNA-Bindung und DNA-Spaltung durch die Restriktionsendonuklease <i>EcoRII</i>	15
1.6	Spezifische DNA-Erkennung durch <i>EcoRII</i>	17
2	RESULTATE	19
2.1	Nachweis der von <i>EcoRII</i> induzierten DNA-Schlaufen durch Elektronenmikroskopie: Substitution von Val ²⁵⁸ durch Asn entkoppelt spezifische DNA-Erkennung von kooperativer DNA-Wechselwirkung und Spaltung	19
2.1.1	Herstellung der <i>EcoRII</i> -Mutante V258N	19
2.1.2	Spezifische DNA-Bindung von <i>EcoRII</i> induziert die Bildung von DNA-Schlaufen: Elektronenmikroskopische Aufnahmen	20
2.1.3	DNaseI-Footprint-Untersuchungen des <i>EcoRII</i> -Wildtyps und der Mutante V258N	21
2.1.4	Vergleich der DNA-Bindungs- und Spalteigenschaften sowie der Sekundärstrukturverteilungen von <i>EcoRII</i> -Wildtyp-Protein und Mutante V258N	23
2.1.5	Bestimmung der molekularen Masse und des oligomeren Status des <i>EcoRII</i> -Wildtyps und der Mutante V258N durch zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	25
2.1.6	Analytische Ultrazentrifugation von <i>EcoRII</i> -Wildtyp und Mutante V258N	26
2.2	Vergleichende kinetische Untersuchung der Spaltung superhelikaler Plasmid-DNA mit einer oder zwei DNA-Erkennungssequenzen durch <i>EcoRII</i> und <i>PspGI</i>	28
2.2.1	Kinetik der Spaltung von Plasmid-DNA mit einer DNA-Erkennungssequenz für <i>EcoRII</i> und <i>PspGI</i>	28
2.2.2	Kinetik der Spaltung von Plasmid-DNA mit zwei DNA-Erkennungssequenzen für <i>EcoRII</i> und <i>PspGI</i>	30
2.3	Photochemische Vernetzung von <i>EcoRII</i> mit den Basen der DNA-Erkennungssequenz zeigt ein asymmetrisches Vernetzungsmuster	32
2.3.1	Interaktion von <i>EcoRII</i> mit innerhalb der Erkennungssequenz modifizierten Oligonukleotidduplexen	32
2.3.2	Photochemische Vernetzung von <i>EcoRII</i> mit der DNA-Erkennungssequenz	34
2.3.3	Identifizierung des photochemisch vernetzten <i>EcoRII</i> -Peptids	36

2.3.4	Mutationsanalyse der elektronenreichen Aminosäuren innerhalb des photochemisch vernetzten <i>EcoRII</i> -Peptids	38
2.4	Die Domänenorganisation von <i>EcoRII</i> wirft Licht auf die Evolution der Restriktionsendonukleasen	40
2.4.1	Limitierte Proteolyse von <i>EcoRII</i>	40
2.4.2	Klonierung der protease-resistenten Domänen von <i>EcoRII</i> und deren Reinigung	43
2.4.3	DNA-Bindungs- und Spaltungseigenschaften der protease-resistenten Domänen	43
2.4.4	Oligomerer Status der protease-resistenten Domänen <i>EcoRII</i> ⁴⁻¹⁹² und <i>EcoRII</i> ¹⁷³⁻⁴⁰⁴	46
3	DISKUSSION	48
4	EXPERIMENTELLE VERFAHREN	64
4.1	Transmissionselektronenmikroskopie	64
4.2	Ortsspezifische Mutagenese	64
4.3	Enzymexpression und –reinigung	65
4.4	DNaseI-Footprinting	65
4.5	Gel-Shift Versuche mit <i>EcoRII</i> -Wildtyp Enzym und <i>EcoRII</i> -Mutanten zur K _D -Wert-Bestimmung	65
4.6	Test der Spaltaktivität des <i>EcoRII</i> -Wildtyp Enzyms und der unterschiedlichen <i>EcoRII</i> -Mutanten	66
4.7	CD-Spektroskopie	66
4.8	Zwei-dimensionale Elektrophorese	67
4.9	Analytische Ultrazentrifugation	67
4.10	Kinetiken	68
4.11	Gel-Shift-Versuche und Spaltung der für die photochemische Vernetzung modifizierten Oligonukleotidduplexe	68
4.12	Photochemische Vernetzungsreaktion mit <i>EcoRII</i>	69
4.13	Identifikation des photochemisch vernetzten <i>EcoRII</i> -Peptids	70
4.14	Limitierte Proteolyse von <i>EcoRII</i> in Gegenwart und Abwesenheit von DNA	70
4.15	Edman-Sequenzierung	71
4.16	Klonierung und Expression der protease-resistenten Domänen von <i>EcoRII</i>	71
4.17	Western Blots	72
4.18	Spaltung von DNA des Phagen T3 mit Wildtyp- <i>EcoRII</i> und <i>EcoRII</i> ¹⁷³⁻⁴⁰⁴	72

Zusammenfassung

Die Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* erfordert im Gegensatz zu den orthodoxen und allgemein bekannten Typ II Restriktionsendonukleasen die gleichzeitige kooperative Wechselwirkung mit zwei Kopien ihrer DNA-Erkennungssequenz 5'CCWGG, um die spezifische endonukleolytische Spaltung der DNA zu katalysieren. Dabei ist *EcoRII* wie die Typ II Restriktionsendonukleasen ein Homodimer. Ebenso wie *EcoRII* interagieren andere DNA prozessierende Proteine, wie ortsspezifische DNA-Rekombinasen, Transposasen, Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturenzyme, mit zwei DNA-Erkennungsorten. Außer dieser Gemeinsamkeit unterstützen die konservierten Aminosäurereste, die zwischen *EcoRII* und der Integrase-Familie der ortsspezifischen DNA-Rekombinasen gefunden wurden, daß diese Proteine entfernt verwandt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie bewiesen, daß *EcoRII* die Bildung von DNA-Schlaufen an einem linearen DNA-Substrat mit zwei DNA-Erkennungsorten induziert - ähnlich wie andere DNA prozessierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Ausgehend von einer konservierten Aminosäuresequenzfolge zwischen *EcoRII* und der Typ II Restriktionsendonuklease *SsoII*, die die DNA-Sequenz 5'CCNGG erkennt, wurde die Aminosäure Val²⁵⁸ von *EcoRII* gegen Asn ausgetauscht. Infolge dieses Austausches entstand die monomere Mutante V258N, die zwar spezifisch an die DNA binden, jedoch nur eingeschränkt DNA-Schlaufen bilden konnte und unfähig war, die DNA effektiv zu spalten. Daraus schließen wir, daß die Aminosäure Val²⁵⁸ bedeutend zur Dimerisierung von *EcoRII* beiträgt und daß die Spaltung der DNA nur durch das intakte *EcoRII*-Dimer möglich ist.

Die Kinetiken der DNA-Spaltreaktion von *EcoRII* mit superhelikaler Plasmid-DNA, die entweder eine oder zwei Erkennungssequenzen für *EcoRII* enthielt, zeigten, daß *EcoRII* in einem Spalt ereignis nur an einem der beiden DNA-Erkennungsorte spaltet. Daher schlagen wir vor, daß pro *EcoRII*-Dimer zwei katalytische Zentren existieren, die die Spaltung des DNA-Doppelstranges an einem DNA-Erkennungsort bewirken. Wir postulieren für ein *EcoRII*-Dimer zwei unterschiedliche DNA-Bindungstaschen – an die eine bindet *EcoRII* den

DNA-Erkennungsort, der als DNA-Substrat gespalten wird, an die andere bindet *EcoRII* den DNA-Erkennungsort, der die DNA-Spaltung aktiviert.

Um direkte Kontakte von *EcoRII* zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz zu identifizieren, führten wir photochemische Vernetzungsexperimente durch. Die photochemische Vernetzung von *EcoRII* mit der DNA zeigte ein asymmetrisches Muster zu den Basen der Erkennungssequenz. Wir konnten zeigen, daß das asymmetrische Vernetzungsmuster durch die partielle Asymmetrie der ansonsten palindromischen DNA-Erkennungssequenz 5'CCA/TGG an der Position des zentralen A/T-Paares induziert ist. Die Aminosäure Tyr⁴¹ von *EcoRII* bildet die einzige gefundene Vernetzung zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz aus, nämlich zu dem äußeren C des 5'CCAGG-Stranges.

Durch die limitierte Proteolyse von *EcoRII* durch Trypsin und Chymotrypsin fanden wir, daß ein *EcoRII*-Monomer aus zwei funktionellen Domänen besteht. Die getrennt exprimierte und gereinigte C-terminale Domäne spaltet die DNA effizient an einzelnen DNA-Erkennungsorten, und verhält sich dementsprechend nicht wie eine Typ IIE, sondern wie eine Typ II Restriktionsendonuklease. Die N-terminale Domäne bindet spezifisch und mit hoher Substrataffinität an die DNA. Daher vermindert die N-terminale Domäne offensichtlich die Aktivität von *EcoRII*, indem sie die DNA-Spaltung durch *EcoRII* von einem zweiten Erkennungsort abhängig macht. Aufgrund dieser Ergebnisse spekulieren wir, daß ein hypothetischer Vorläufer der heutigen Restriktionsendonuklease *EcoRII* eine zusätzliche DNA-bindende Domäne akquirierte, um die Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungsorten zu ermöglichen. Die Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungsorten ist ebenfalls essentielle Voraussetzung für DNA-Rekombination und Transposition. Daher könnte die gegenwärtige *EcoRII*-Restriktionsendonuklease ein evolutionärer Übergang von ortsspezifischen Endonukleasen zu einem neuen Protein sein, das spezifisch mit zwei DNA-Orten arbeitet.

1 Einleitung

1.1 Restriktionsendonukleasen – ihr Vorkommen, ihre Funktion und Bedeutung

Restriktionsendonukleasen sind in prokaryotischen Organismen weit verbreitet und gewöhnlich Teil eines Restriktions- und Modifikationssystems, das eine Restriktionsendonuklease und eine DNA-Methyltransferase umfaßt [1]. Diese beiden Enzyme eines Restriktions- und Modifikationssystems erkennen die gleiche DNA-Sequenz auf höchst spezifische Art und Weise. DNA-Methyltransferasen übertragen eine Methylgruppe vom Cofaktor S-Adenosylmethionin auf eine Nukleinsäurebase ihrer DNA-Erkennungssequenz innerhalb zelleigener DNA. Diese Methylierungspositionen, nach denen die DNA-Methyltransferasen auch klassifiziert werden, sind das N⁴- oder C⁵-Atom eines Cytosins oder das N⁶-Atom eines Adenins [1]. Die Restriktionsendonukleasen unterscheiden zelleigene von zellfremder DNA, die z.B. durch Bakteriophagen-Infektion in die Zelle gelangte, aufgrund der spezifischen Methylierung der zelleigenen DNA. Die zellfremde, unmethylierte oder nicht-spezifisch methylierte doppelsträngige DNA wird durch die von der Restriktionendonuklease katalysierte Hydrolyse einer Phosphordiesterbindung innerhalb oder nahe der DNA-Erkennungssequenz gespalten und damit zerstört [2]. Daher ist die mögliche Funktion der Restriktions- und Modifikationssysteme der Schutz des prokaryotischen Wirtsgenoms vor zellfremder DNA. Daneben wird eine Beteiligung an DNA-Rekombination und Transposition als weitere mögliche Funktion diskutiert [3].

Neben der Schutzfunktion der Restriktions- und Modifikationssysteme formulierten Kobayashi *et al.* die These, daß sich die Genkomplexe der Restriktions-Modifikationssysteme als egoistische, mobile genetische Elemente verhalten können, vergleichbar den Viren, Transposons und Homing-Endonukleasen [4]. Dieses egoistische Verhalten der Restriktions-Modifikationssysteme besteht darin, daß sie bei Bedrohung ihres Erhalts in einer Wirtszelle, wie z.B. durch ein konkurrierendes genetisches Element, den Tod ihrer Wirtszelle durch Restriktionsspaltung des Wirtsgenoms herbeiführen können [4]. Ein konkurrierendes genetisches Element kann z.B. ein inkompatibles Plasmid oder ein alleles

homologes Stück DNA sein, das für ein konkurrierendes Restriktions-Modifikationssystem kodiert. Das egoistische Verhalten kann für das Restriktions-Modifikationssystem insofern Wettbewerbsvorteile bringen, daß es seinen Wirt vor der Zerstörung durch das konkurrierende genetische Element verläßt [4]. Dafür spricht, daß Restriktions-Modifikationssysteme extensiven horizontalen Gentransfer durchlaufen haben, und daß sie oft mit anderen mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Viren, Transposons und Integrans verbunden sind [4]. Eine weitere Hypothese hebt hervor, daß die Unabhängigkeit und die Mobilität der Restriktions-Modifikationssysteme zur Form und genetischen Variabilität der bakteriellen Genome beitragen, indem sie die Häufigkeit genetischer Veränderungen modulieren [5]. Diese Modulation besteht darin, daß Restriktionsenzyme einerseits die Aufnahme fremder Genfunktionen in die Wirtszelle durch die Spaltung zellfremder DNA reduzieren (Schutzfunktion), andererseits aber stellen die erzeugten Restriktionsfragmente grundsätzlich rekombinierbare DNA-Fragmente dar, die unter geeigneten Umständen in das Rezipientengenom aufgenommen werden können [5]. Eine neue, verschiedene Bakterien- und Phagengenome vergleichende Analyse, zeigte daß die Vermeidung von palindromischen DNA-Erkennungssequenzen für Restriktion-Modifikationssysteme (quasi als Selbstschutz vor Restriktion) in Phagengenomen weniger bedeutend ist als in den bakteriellen Wirtsgenomen [6]. Daher kann die Funktion der Restriktions-Modifikationssysteme gegenwärtig nicht als lediglich egoistisch und ebenso nicht als lediglich vor Phageninfektion schützend betrachtet werden. Vielmehr plädieren Rocha *et al.* für eine eigene, nicht-triviale Funktion der Restriktions-Modifikationssysteme in der Wirt-Parasit-Beziehung von Bakterien und Phagen. Diese Funktion ist gegenüber dem bakteriellen Wirt eher eine parasitäre, die vielleicht an der Grenze zur Wechselseitigkeit (Symbiose) ist [6].

Gegenwärtig sind etwa 3.400 Restriktionsendonukleasen bekannt [7], die entsprechend ihrer Zusammensetzung aus Untereinheiten, ihren Cofaktoranforderungen, der Struktur ihrer DNA-Erkennungssequenz und der Lage des Spaltortes in die drei Typen I, II und III unterschieden werden [8]. Typ I und Typ III Restriktionsenzyme sind heterooligomere, multifunktionale Proteinkomplexe, die hauptsächlich Gegenstand der Grundlagenforschung sind [8]. Den Typ II Restriktionsendonukleasen, insbesondere den orthodoxen (siehe unten), kommt von allen Typen der Restriktionsendonukleasen die größte Bedeutung zu. Sie sind essentiell für das Klonen und waren damit Wegbereiter der modernen Molekularbiologie und Biotechnologie. Weiterhin werden sie für die Genanalyse (Genkartierungen) verwendet. Ihre extrem hohe Genauigkeit bei der spezifischen Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung macht sie zu einem interessanten und exzellenten Modellsystem der Grundlagenforschung. Sie ermöglichen die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen, und als eine der am

besten untersuchten Proteinfamilien erlauben sie, insbesondere nach dem Lösen einiger Kristallstrukturen, evolutionäre Zusammenhänge innerhalb einer großen Familie funktionell verwandter Proteine zu rekonstruieren.

1.2 Subtypen der Typ II Restriktionsendonukleasen

In den vergangenen Jahren wurden einige Restriktionsendonukleasen entdeckt, die intermediären Typen zuzuordnen wären, so daß die Klassifizierung in die drei Typen I, II und III nicht mehr ausreichend ist [3]. Dementsprechend wurden die Typ I und die Typ II Restriktionsendonukleasen weiter in Familien bzw. Subtypen untergliedert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Restriktionsendonuklease des Typs II. Dessen Subtypen werden im folgenden ausführlicher charakterisiert (Tab. 1).

Die orthodoxen Typ II Restriktionsendonukleasen sind Homodimere, die palindromische DNA-Sequenzen von 4-8 bp Länge erkennen und in Gegenwart des einzigen Cofaktors, Magnesiumionen (Mg^{2+}), innerhalb oder dicht an der DNA-Erkennungssequenz in beiden Strängen symmetrisch spalten [3]. Man unterscheidet Restriktionsendonukleasen, die 5'-überhängende Enden produzieren, wie z.B. *EcoRI*, die stumpfe Enden produzieren, wie z.B. *EcoRV*, und die 3'-überhängende Enden produzieren, wie z.B. *BglI* [3].

Die monomeren Typ IIS Restriktionsendonukleasen erkennen eine asymmetrische DNA-Erkennungssequenz und spalten den DNA-Doppelstrang in einem definierten Abstand von ihrer DNA-Erkennungssequenz [9]. Die am besten verstandene Typ IIS Restriktionsendonuklease ist *FokI*. Das in Lösung monomere Enzym dimerisiert in Gegenwart von spezifischer DNA und Mg^{2+} und bindet dabei gleichzeitig zwei Erkennungsorte [10,11]. Entsprechend zeigt *FokI* eine positive Substratkooperativität [10].

Die dimeren Typ IIE Restriktionsendonukleasen erfordern die gleichzeitige Wechselwirkung mit zwei Kopien ihrer DNA-Erkennungssequenz, um das DNA-Substrat zu spalten [12]. Beispiele sind die Restriktionsendonukleasen *NaeI* [13], welche stumpfe Enden produziert und *EcoRII*, welche 5'-überhängende Enden hinterläßt [14] und Forschungsgegenstand dieser Arbeit ist. Eine der beiden DNA-Erkennungssequenzen dient als Substrat für die Spaltung, die andere als allosterischer Effektor [13]. *EcoRII* zeigt ebenso wie *FokI* eine positive Substratkooperativität [15].

Die homotetrameren Typ IIF Restriktionsendonukleasen benötigen ebenfalls zwei DNA-Erkennungssequenzen, um die DNA erfolgreich zu spalten. Im Gegensatz zu den Typ IIE Enzymen spalten die Typ IIF Restriktionsendonukleasen, wie z. B. *SfiI* und *NgoMIV*, beide DNA-Doppelstränge der beiden DNA-Erkennungssequenzen in einer konzertierten Reaktion [16].

Die speziellen Eigenschaften aller Subtypen sind in der Tabelle aufgeführt. Offensichtlich weisen die Subtypen IIT, IIG, IIB und IIM weniger Ähnlichkeiten zu den Typ IIE Restriktionsendonukleasen auf als die Subtypen IIS und IIF.

Tabelle 1: Untergliederung der Typ II Restriktionsendonukleasen, modifiziert nach Pingoud und Jeltsch [3]. Der Spaltort ist durch ↓ gekennzeichnet.

Subtyp	Charakteristik	Beispiel	DNA-Erkennungssequenz
orthodox	Die palindromische DNA-Erkennungssequenz wird von einem homodimeren Enzym erkannt, das innerhalb oder dicht an der DNA-Erkennungssequenz spaltet.	<i>EcoRI</i>	G↓AATTC CTTAA↑G
Typ IIS	Die Spaltung erfolgt in definiertem Abstand zur asymmetrischen DNA-Erkennungssequenz. Das Enzym dimerisiert in Gegenwart von spezifischer DNA und Mg^{2+} und interagiert <i>ergo</i> mit zwei DNA-Erkennungssequenzen.	<i>FokI</i>	GGATGN ₉ ↓NNNN CCTACN ₉ NNNN↑
Typ IIE	Die homodimeren Enzyme erfordern zwei DNA-Erkennungssequenzen, eine davon dient als allosterischer Effektor.	<i>NaeI</i>	GCG↓CGC CGC↑GCG
Typ IIF	Die homotetrameren Enzyme erfordern zwei DNA-Erkennungssequenzen, die beide in einer konzertierten Reaktion gespalten werden.	<i>NgoMIV</i>	G↓CCGGC C↑GGCCG
Typ IIT	Die Enzyme bestehen aus verschiedenen Untereinheiten für Restriktions- und Modifikationsaktivität.	<i>Bpu10I</i>	CC↓TNAGC GGANT↑CG
Typ IIG	In einer Polypeptidkette sind Restriktions- und Modifikationsaktivität vereint.	<i>Eco57I</i>	CTGAAGN ₁₄ NN↓ GACTTCN ₁₄ ↑NN
Typ IIB	Die Spaltung erfolgt an beiden Seiten der DNA-Erkennungssequenz.	<i>BcgI</i>	NN↓N ₁₀ CGAN ₆ TGCN ₁₀ NN↓
Typ IIM	Die DNA-Erkennungssequenz ist methyliert.	<i>DpnI</i>	G ^m A↓TC CT↑ ^m AG

1.3 Kristallstrukturen von Restriktionsendonukleasen und ihre evolutionäre Verwandtschaft mit anderen Enzymen

In den letzten Jahren wurden die Kristallstrukturen für 14 verschiedene Restriktionsendonukleasen aufgeklärt. Diese Kristallstrukturen trugen enorm zum

Verständnis der höchst-spezifischen Erkennung von DNA-Sequenzen durch Restriktionsendonukleasen bei. Neben den Strukturen der orthodoxen Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI*, *PvuII*, *EcoRV*, *BglI*, *BglII*, *BsoBI* und *MunI* und *HincII* wurden die Strukturen des Typ IIS Enzyms *FokI*, des Typ IIE Enzyms *NaeI*, und der Typ IIF Enzyme *Cfr10I*, *NgoMIV* und *Bse634I* gelöst [17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30]. Obwohl die Primärsequenzen der Restriktionsendonukleasen nur wenige oder gar keine Homologien untereinander aufweisen, deckten die bekannten Kristallstrukturen der Restriktionsendonukleasen ein für alle sehr ähnliches Kernmotiv auf [31]. Dieses Kernmotiv besteht aus einer fünfsträngigen gemischten β -Faltblattstruktur, die von zwei α -Helices flankiert wird [31,32]. Die Kristallstrukturen von anderen Proteinen, die ebenfalls eine Endonukleasefunktion besitzen, zeigten, daß dieses Kernmotiv auch von der λ -Exonuklease [33], von MutH, das in die methylgerichtete Mismatch-Reparatur involviert ist [34], von der Vsr Endonuklease, die an der Mismatchreparatur von TG-Fehlpaarungen beteiligt ist [35] und von TnsA, einer Untereinheit der Tn7 Transposase, geteilt wird [36]. In dem konservierten Kernmotiv befinden sich die für die Katalyse notwendigen Aminosäuren: Das katalytische Zentrum setzt sich gewöhnlich aus einem Aspartat- und einem Glutamat- oder Aspartatrest sowie einem Lysinrest zusammen, nämlich [(P)D...(D/E)XK], [3].

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten wird für Typ II Restriktionsendonukleasen und für die anderen Proteine mit Endonukleasefunktion ein gemeinsames, wenn auch entferntes Vorläuferprotein angenommen [3]. Der Vergleich der Strukturen und der Funktionsweise von Typ II Restriktionsendonukleasen legt die phylogenetisch divergente Entwicklung der Restriktionsendonuklease-Superfamilie in zwei Hauptlinien nahe. Die eine Linie besteht in der *EcoRV*-ähnlichen Familie, mit den Enzymen *EcoRV*, *PvuII*, *BglI* und MutH sowie der λ -Exonuklease, die andere in der *EcoRI*-ähnlichen Familie mit den Enzymen *EcoRI*, *BamHI*, *Cfr10I* und *FokI*. Die *EcoRV*-ähnliche Familie bindet die DNA über die kleine Furche und generiert stumpfe Enden, während die *EcoRI*-ähnliche Familie die DNA über die große Furche bindet und 5'-überhängende Enden generiert. Weiterhin scheinen die durch die Restriktionsendonuklease produzierten DNA-Enden eher als die DNA-Erkennungssequenz den Dimerisierungsmodus der Enzyme zu bedingen [3,37].

Angeichts der Kristallstrukturen der homotetrameren Typ IIF Restriktionsendonukleasen *Cfr10I*, *NgoMIV* und *Bse634I* kann man diese als ein aus zwei Dimeren zusammengesetztes Tetramer betrachten, was für einen kontinuierlichen Übergang zwischen orthodoxen und Typ IIF Restriktionsendonukleasen spricht [3,28,29,30]. Die Kristallstrukturanalyse der Typ IIS Restriktionsendonuklease *FokI* aber offenbarte eine zwei Domänen umfassende Struktur

[26]. Die N-terminale DNA-Erkennungsdomäne zeigte eine dem Helix-Turn-Helix-Motiv verwandte DNA-bindende Domäne, wie sie im „catabolite gene activator protein“ (CAP) vorkommt. Die C-terminale Spaltdomäne ist dem *Bam*HI-Monomer strukturell ähnlich. Im Kristall liegt *Fok*I dimer vor, wobei die Dimerisierung über Kontakte der Spaltdomänen vermittelt wird. Obwohl *Fok*I in Lösung monomer ist, erfordert die Spaltung des DNA-Doppelstranges die Dimerisierung des Proteins [10]. Wie kürzlich gezeigt wurde, ist die Dimerisierung von *Fok*I von Mg^{2+} abhängig [11]. Außerdem ist für die Aktivierung des Enzyms die Bindung an zwei DNA-Erkennungsorte essentiell, was den Typ IIF und insbesondere den Typ IIE Restriktionsendonukleasen ähnlich ist [11].

Die Kristallstrukturanalysen der Typ IIE Restriktionsendonuklease *Nae*I zeigten ebenfalls eine zwei Domänen umfassende Struktur eines *Nae*I-Monomers [27]. Die C-terminale Topo-Domäne enthält ein Helix-Turn-Helix-Motiv ähnlich dem im CAP, und entspricht der Aktivator-Bindungsstelle in *Nae*I [27,38]. Die N-terminale Endo-Domäne ist den Strukturen der Typ II Restriktionsendonukleasen sehr ähnlich und für die Bindung und Spaltung des DNA-Substrates verantwortlich. Die Dimerisierung von *Nae*I wird hauptsächlich über die Endo-Domäne vermittelt. Die Struktur des *Nae*I-DNA-Komplexes zeigte erstmalig wie zwei verschiedene DNA-bindende Motive (Topo- und Endo-Motiv) die gleiche DNA-Sequenz spezifisch erkennen können [38]. Als bisher einzige Kristallstruktur einer Typ IIE Restriktionsendonuklease ist die von *Nae*I im Komplex mit spezifischer DNA dargestellt (Abb. 1), um eine Vorstellung von dem Enzym-Substrat-Komplex zu vermitteln.

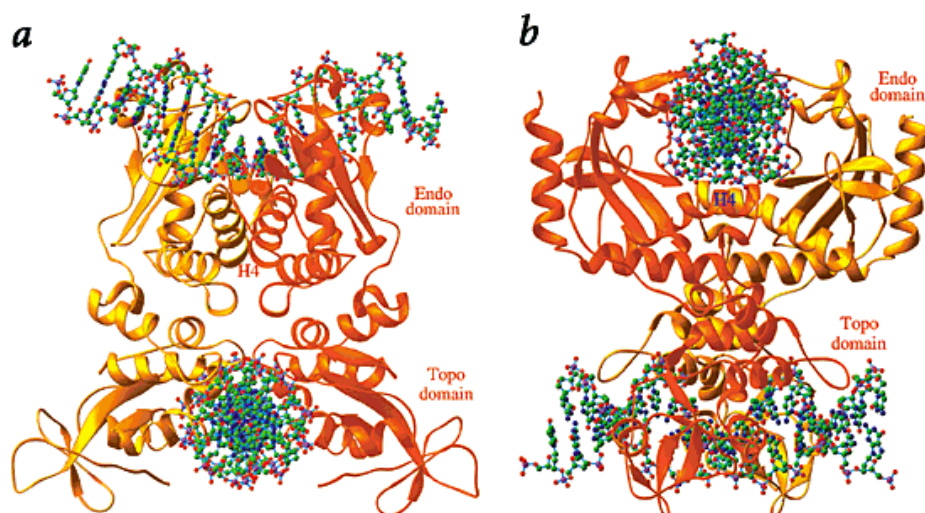


Abb. 1. Kristallstruktur der Restriktionsendonuklease *Nae*I im Komplex mit spezifischer DNA aus [38]. Gelb bzw. orange kennzeichnen jeweils ein *Nae*I-Monomer. *b* zeigt die Struktur *a* nach einer Drehung von 90° um die 2-fache Drehsymmetrieachse des Moleküls.

1.4 Wechselwirkung der Restriktionsendonukleasen mit der DNA

Die Wechselwirkung der Restriktionsendonukleasen mit der DNA ist ein komplexer, mehrstufiger Prozeß, der mit der unspezifischen Bindung an die makromolekulare DNA beginnt [3]. Für die Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *BamHI* konnten außer den Kristallstrukturen der freien Enzyme und der spezifischen Enzym-DNA-Komplexe auch die Kristallstrukturen der unspezifischen Enzym-DNA-Komplexe gezeigt werden [20,39]. Aus deren Vergleich geht hervor, daß die Kontaktfläche im unspezifischen Enzym-DNA-Komplex wesentlich kleiner ist als im spezifischen Komplex [20,39]. Im unspezifischen Komplex werden *direkte* Kontakte weder zu den Nukleinsäurebasen noch zum DNA-Phosphatrückgrat beobachtet. Die unspezifische Komplexbildung ist hauptsächlich über transiente Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt und ermöglicht die lineare Diffusion des Enzyms entlang der DNA ("Sliding"). Während des „Slidings“ sucht das Enzym die DNA nach seiner DNA-Erkennungssequenz ab [40]. Dabei befindet sich das katalytische Zentrum des Enzyms in sicherem Abstand zum DNA-Phosphatrückgrat [3]. Das „Sliding“ ermöglicht das schnelle Auffinden einer DNA-Erkennungssequenz. Außerdem erhöht das „Sliding“ die Prozessivität der Enzyme und beschleunigt die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes), [3]. Erreicht das Enzym die DNA-Erkennungssequenz, so erfolgt die höchst kooperative Umwandlung des unspezifischen Komplexes in einen spezifischen. Dabei ändern sich konzentriert die Konformationen des Enzyms als auch der DNA (induced fit), [3]. Dabei werden weitaus mehr Wassermoleküle und Gegenionen aus der Grenzfläche von Protein und DNA freigesetzt als bei der Bildung des unspezifischen Enzym-DNA-Komplexes [41]. Die spezifische Bindung von Restriktionsendonukleasen an die DNA-Erkennungssequenz ist gekennzeichnet durch extensive direkte Kontakte zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz (direkte Erkennung). Fast alle verfügbaren Akzeptoren und Donatoren für Wasserstoffbrückenbindungen in der großen Furche werden für direkte Kontakte zwischen Protein und DNA genutzt [3]. Zusätzlich wird die spezifische Bindung durch Kontakte zum Phosphatrückgrat und über Wassermoleküle (indirekte Erkennung) vermittelt. Die Kokristallstrukturen zeigten auch, daß die Kontakte der Restriktionsendonukleasen im spezifischen Komplex mit der DNA im allgemeinen entsprechend ihren palindromischen DNA-Erkennungssequenzen eine charakteristische 2-fache Rotationssymmetrie besitzen.

Allgemein sind die an DNA-Bindung, DNA-Spaltung und Proteindimerisierung beteiligten Regionen des Proteins eng miteinander verflochten, was bedeutet, daß die an einer bestimmten Funktion beteiligte Region häufig auch für andere Funktionen wichtig ist [3]. Jedoch ist die hoch-kooperative Kopplung von spezifischer DNA-Bindung, Erkennung und Aktivierung der Katalyse aufgrund fehlender zeitaufgelöster Strukturanalysen noch immer

wenig verstanden. Ebenso werden für den Mechanismus der DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen - die katalytische Hydrolyse einer Phosphordiesterbindung - verschiedene Modelle diskutiert [3]. Grundsätzlich handelt es sich um eine nukleophile Substitutionsreaktion mit Inversion der Konfiguration am Phosphoratom (S_{N2} -Reaktion). Aus den bisher bekannten Kristallstrukturanalysen wurde ein schwach konserviertes katalytisches Sequenzmotiv definiert, das (P)D...D/EXK-Motiv, welches allerdings nicht für alle Restriktionendonukleasen gültig sein muß [37]. Dieses (P)D...D/EXK-Motiv wurde auch in den anderen Endonukleasestrukturen wie der λ -Exonuklease, MthH und TnsA gefunden [33,34,35,36]. Der Cofaktor Mg^{2+} ist zweifellos in den katalytischen Prozeß involviert und könnte über die Carboxylate der Aminosäuren des katalytischen Zentrums koordiniert sein [3]. Es ist bislang nicht geklärt, wieviele Mg^{2+} -Ionen direkt an der Katalyse beteiligt sind, was für die Aufklärung der möglichen Spaltmechanismen wichtig wäre. Bisher ist der Mechanismus der DNA-Spaltung für keine Restriktionsendonuklease endgültig aufgedeckt.

1.5 Kooperative DNA-Bindung und DNA-Spaltung durch die Restriktionsendonuklease *EcoRII*

Die homodimere Restriktionsendonuklease *EcoRII* aus *Escherichia coli* erkennt die Sequenz 5'↓CCWGG und spaltet vor dem ersten C wie der Pfeil indiziert [14]. Die korrespondierende C⁵-DNA-Methyltransferase, M.*EcoRII*, methyliert das zweite C der DNA-Erkennungssequenz, was die Spaltung durch *EcoRII* verhindert [14]. *EcoRII* gehört zum Subtyp IIE der Typ II Restriktionsendonukleasen und hat mit His₆-Schwanz eine molekulare Masse von ca. 46,6 kD pro Monomer [42]. Folgende Studien zu den Substratanforderungen von *EcoRII* ließen darauf schließen, daß *EcoRII* für die effektive Spaltung eines DNA-Substrates die simultane, funktionelle Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungssequenzen erfordern könnte. Die initiale Beobachtung war, daß die Effizienz der DNA-Spaltung durch *EcoRII* mit der Anzahl der DNA-Erkennungssequenzen im DNA-Substrat korreliert [43]. DNA-Substrate, die nur wenige DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* aufweisen, werden durch *EcoRII* nur sehr schlecht oder gar nicht gespalten, während DNA-Substrate, in denen die DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII* häufiger vorkommt, gut gespalten werden [43]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Spaltung von DNA mit wenigen DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* durch die Zugabe von DNA, die mehrere solcher DNA-Erkennungssequenzen enthält oder durch Oligonukleotidduplexe, die die DNA-Erkennungssequenz beinhalten, stimuliert bzw. aktiviert werden kann [43,44]. Zusätzlich unterstützt die durch kinetische Untersuchungen erwiesene positive Substratkooperativität für *EcoRII* die Hypothese, daß *EcoRII* die Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungssequenzen erfordert [15,45].

Grundsätzlich kann die Wechselwirkung von *EcoRII* mit zwei DNA-Erkennungsorten auf einem (intramolekular, in *cis*) oder auf zwei verschiedenen DNA-Molekülen (intermolekular, in *trans*) erfolgen. Die Wechselwirkung in *cis* wird hierbei bevorzugt. *EcoRII* kann jedoch ebenfalls effizient in *trans* reagieren [42]. Steigende Konzentration und abnehmende Länge der DNA-Substrate begünstigen dabei die Reaktion in *trans*. Gelfiltrations- und Titrationsexperimente zeigten, daß ein *EcoRII*-Dimer für die kooperative Bindung von zwei DNA-Erkennungssequenzen verantwortlich ist [42,46].

Mittels modifizierter Oligonukleotidduplexe wurde demonstriert, daß *EcoRII* in einem Spaltereignis die zwei Phosphordiesterbindungen einer DNA-Erkennungssequenz in einer konzertierten Reaktion spaltet [47]. Bis heute ist aber nicht restlos geklärt, ob *EcoRII* in besonderen Fällen, z.B. wenn sich die beiden DNA-Erkennungssequenzen in einem für das Enzym optimalen Abstand von 10 bp befinden, konzertiert an beiden DNA-Erkennungssequenzen spalten kann wie die Typ IIF Restriktionsendonukleasen [42,48]. In jedem Fall aber wird lineare DNA, die zwei DNA-Erkennungssequenzen in einem Abstand von mehr als 1.000 bp enthält, nicht mehr durch *EcoRII* gespalten [12]. Andererseits wird die Spaltung durch *EcoRII* nicht verhindert, wenn ein molekularer Block wie der Lac-Repressor zwischen zwei DNA-Erkennungssequenzen gebunden ist. Aufgrund dieser Tatsachen und da *EcoRII* keinen Energieträger wie ATP oder GTP als Cofaktor benötigt wie die Typ I und III Restriktionsenzyme, kann man annehmen, daß die Kommunikation von *EcoRII* mit zwei DNA-Erkennungssequenzen keinen aktiven DNA-Transportprozeß wie die DNA-Translokation einschließt [42]. Es ist vielmehr anzunehmen, daß *EcoRII* die Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungssequenzen in *cis* durch Biegen bzw. Schlaufenbildung der dazwischenliegenden DNA erreicht. Eines der Ziele dieser Arbeit war deshalb, die simultane Bindung von *EcoRII* an zwei DNA-Erkennungssequenzen durch die elektronenmikroskopische Darstellung dieses Komplexes und der damit verbundenen DNA-Schlaufenbildung zu zeigen.

Wie bereits erwähnt, ist nicht restlos aufgeklärt, ob *EcoRII* - möglicherweise in Abhängigkeit vom Abstand zweier interagierender DNA-Erkennungsorte - die Phosphordiesterbindungen in beiden Strängen einer oder beider DNA-Erkennungssequenzen konzertiert spalten kann. Zu diesem Zweck schließt die vorliegende Arbeit kinetische Untersuchungen an superhelikaler Plasmid-DNA ein, die eine bzw. zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* enthält. Aus diesen speziellen Kinetiken können Informationen über Reaktionszwischenstufen und Reaktionsprodukte gewonnen werden, die helfen sollen die

Frage nach der konzertierten Spaltung der vier Phosphordiesterbindungen von zwei DNA-Erkennungssequenzen zu beantworten [29,30,48,49,50].

1.6 Spezifische DNA-Erkennung durch *EcoRII*

Mittels membran-gebundener Peptidbibliotheken konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, daß ein *EcoRII*-Monomer mindestens zwei Regionen enthält, die in die spezifische Wechselwirkung mit der DNA involviert sind [51]. Diese sind die DNA-bindende Region I, welche die Aminosäuren 88-102 umfaßt und die DNA-bindende Region II, welche die Aminosäuren 256-273 umfaßt [51]. Mutationsanalysen bestätigten die funktionelle Bedeutung der beiden Regionen. Dabei wurde beobachtet, daß Mutationen in der N-terminalen DNA-bindenden Region I hauptsächlich die DNA-Bindung beeinträchtigten, jedoch nicht die DNA-Spaltung. Andererseits beeinträchtigten Mutationen in der C-terminalen DNA-bindenden Region II vornehmlich die katalytische Funktion und scheinbar nicht das DNA-Bindungsvermögen [51], (M. Reuter, unveröffentlichte Daten). Bisher ist nicht bekannt, wie die zwei DNA-Erkennungssequenzen durch *EcoRII* erkannt werden, ob ein *EcoRII*-Monomer mit den DNA-bindenden Regionen I und II eine DNA-Bindungstasche bildet und an eine DNA-Erkennungssequenz bindet, oder ob Beiträge aus beiden *EcoRII*-Monomeren eine DNA-Bindungstasche für eine DNA-Erkennungssequenz bilden. Darüber soll die Aufklärung der Domänenorganisation von *EcoRII* in dieser Arbeit Aufschluß bringen.

Obwohl DNA-bindende Regionen und Motive von *EcoRII* beschrieben wurden, sind bislang keine direkten Kontakte zwischen Protein und DNA-Erkennungssequenz bekannt. Weiterhin ist nicht bekannt, ob *EcoRII* zu beiden Strängen einer DNA-Erkennungssequenz identische, direkte Kontakte knüpft, das heißt eine DNA-Erkennungssequenz symmetrisch oder asymmetrisch erkennt. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, direkte Kontakte des Enzyms zu allen möglichen Basen der DNA-Erkennungssequenz mittels photochemischer Vernetzung (UV-Cross-linking) zu identifizieren. Diese photochemische Vernetzungsmethode konnte bereits vielfach erfolgreich eingesetzt werden, um Kontakte zwischen Basen und Aminosäuren in DNA-Protein- als auch RNA-Protein-Komplexen zu identifizieren [52,53,54,55,56,57,58,59,60].

Obwohl Restriktionsendonukleasen untereinander nur wenig oder keine Sequenzhomologien aufweisen, erwies sich die DNA-bindende Region II von *EcoRII* homolog zu einer Teilsequenz von *SsoII*, einer orthodoxen Typ II Restriktionsendonuklease, welche die DNA-Sequenz 5'CCNGG erkennt [51]. Mit dieser und einer weiteren Homologiesuche zur

Restriktionsendonuklease *PspGI* von Morgan *et al.* wurden weitere Restriktionsendonukleasen, die terminale CC:GG-Basenpaare innerhalb ihrer Erkennungssequenz erkennen, in Zusammenhang gebracht [51,61]. Dieser Zusammenhang konnte durch den Vergleich der Kristallstrukturen von *Cfr10I* und *NgoMIV* vertieft werden [62,63]. *Cfr10I* und *NgoMIV*, die beide eine ähnliche DNA-Erkennungssequenz haben (5'Pu↓CCGGPy bzw. 5'G↓CCGGC), ließen ein homologes strukturelles Motiv für die Erkennung der benachbarten GG vermuten [3,62,63]. Die Ausdehnung der Homologiesuche auf weitere Restriktionsendonukleasen verschiedener Subtypen, die in unterschiedlichem Kontext CCGG enthaltende DNA-Sequenzen erkennen, z. B. *SsoII* (5'CCNGG), *PspGI* und *EcoRII* (5'CCWGG), führte zur Identifikation des gemeinsamen Motivs KX₃RXXRX₆E, das vermutlich für die Erkennung der benachbarten GG zuständig ist [3,62]. Weiterhin teilen diese Restriktionsendonukleasen das konservierte katalytische Motiv (P)D...(S)XK...D/E, das eine Variante des für Restriktionsendonukleasen typischen katalytischen Motivs [(P)D...D/EXK] ist und zuerst in der Kristallstrukturanalyse von *Cfr10I* entdeckt wurde [28]. Bisher bestätigen Mutationsanalysen die Bedeutung dieses Motivs für die Restriktionsenzyme *SsoII* und *Ec18kI* [62,63]. Die daraus abgeleitete Hypothese für *EcoRII*, daß die katalytische Aktivität von *EcoRII* mit dem Sequenzmotiv ²⁹⁸PDX₂₄KX₁₁E als mutmaßlichem aktivem Zentrum im C-terminalen Teil und der Aktivatorbindungsort im N-terminalen Teil des Enzyms lokalisiert sein soll, wird durch die vorliegende Arbeit experimentell bestätigt.

Im Kontext der Sequenzhomologien darf nicht unerwähnt bleiben, daß die Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* Aminosäuresequenzmotive enthält, die erlauben, das Enzym der Integrasefamilie der Rekombinasen zuzuordnen [64,65]. Der Austausch des innerhalb dieser Familie konservierten Tyrosinrestes Tyr³⁰⁸ von *EcoRII* gegen Phe führte zum Verlust der Spaltaktivität und verweist damit auf eine funktionelle Bedeutung [65]. Ebenso ist für die Typ IIE Restriktionsendonuklease *NaeI*, eine strukturelle Verwandtschaft zur Familie der Topoisomerasen bekannt [27,38]. *NaeI* zeigt nach einem einzelnen Aminosäureaustausch von L43K Topoisomeraseaktivität [66]. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zur Domänenorganisation von *EcoRII* kann man ausgehend von Restriktionsendonukleasen eine Hypothese zur Evolution neuer Proteinfunktionen formulieren.

2 Resultate

2.1 Nachweis der von *EcoRII* induzierten DNA-Schlaufen durch Elektronenmikroskopie: Substitution von Val²⁵⁸ durch Asn entkoppelt spezifische DNA-Erkennung von kooperativer DNA-Wechselwirkung und Spaltung

2.1.1 Herstellung der *EcoRII*-Mutante V258N

Frühere Untersuchungen zur Protein-DNA-Interaktion von *EcoRII* zeigten, daß die Primärsequenz von *EcoRII* zwei verschiedene DNA-bindende Regionen (I, Aminosäuren 88-102 und II, Aminosäuren 256-273) aufweist, deren Bedeutung Mutationsanalysen untermauerten [51], (M. Reuter unveröffentlichte Ergebnisse). Die Suche nach diesen DNA-bindenden Regionen ähnlichen Peptiden in anderen Restriktionsendonukleasen offenbarte eine signifikante Homologie der DNA-bindenden Region II von *EcoRII* mit den Aminosäuren 110-127 der orthodoxen Typ II Restriktionsendonuklease *SsoII* sowie einige konservierte Sequenzen mit anderen Restriktionsendonukleasen, die terminale C:G oder G:C Basenpaare in ihrer DNA-Erkennungssequenz gemeinsam haben [51]. Zusätzlich wird die Bedeutung der DNA-bindenden Region II durch Untersuchungen des *EcoRII*-Homoisoschizomers *PspGI* unterstützt, denn *PspGI* weist in einem Abschnitt von 87 Aminosäuren bedeutende Ähnlichkeit zur DNA-Bindungsregion II von *EcoRII* auf [61]. Als Homoisoschizomer erkennt *PspGI* die gleiche DNA-Erkennungssequenz wie *EcoRII* und spaltet an gleicher Position [61].

Diese Erkenntnisse zugrunde legend prüften wir einzelne Aminosäuren aus der DNA-bindenden Region II von *EcoRII* hinsichtlich ihrer Rolle in DNA-Erkennung und –Spaltung. Unter Berücksichtigung der Ähnlichkeit der DNA-Erkennungssequenzen von *EcoRII* (5'CCWGG) und *SsoII* (5'CCNGG), tauschten wir die nicht-konservierten Aminosäuren innerhalb der in beiden Enzymen homologen Region aus. Eine der ausgetauschten

Positionen war die unpolare Aminosäure Val²⁵⁸ in *EcoRII*, welche gegen die polare Aminosäure Asn ausgetauscht wurde, die man in *SsoI* an der entsprechenden Position findet. Die resultierende *EcoRII*-Mutante V258N wurde mit einem N-terminalen His₆-Schwanz exprimiert und zu 95 %iger Homogenität gereinigt wie früher beschrieben [42]. Im folgenden untersuchten wir die Eigenschaften dieser Mutante im Vergleich zum *EcoRII*-Wildtyp.

2.1.2 Spezifische DNA-Bindung von *EcoRII* induziert die Bildung von DNA-Schlaufen: Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Um zu beweisen, daß *EcoRII* gleichzeitig zwei Erkennungsorte binden kann, versuchten wir Komplexe des Enzyms mit verschiedenen DNA-Substraten elektronenmikroskopisch abzubilden. Wir fanden, daß die Bindung von *EcoRII* an ein 1.202 bp langes DNA-Molekül, das zwei Erkennungsorte für *EcoRII* in 191 bp Abstand enthielt, die Bildung von DNA-Schlaufen verursacht (Abb. 2a). Um zu zeigen, daß die Bildung dieser DNA-Schlaufen spezifisch zwischen den beiden DNA-Erkennungsorten für *EcoRII* auftrat, vermaßen wir mit Hilfe eines Digitalisiertabletts die drei Teillängen der Konturen von 90 der DNA-Moleküle, die Schlaufen aufwiesen. Die drei Teillängen (kurzes DNA-Ende, DNA-Schleife, langes DNA-Ende) konnten aufgrund der asymmetrischen Lage der *EcoRII*-Erkennungsorte im DNA-Molekül eindeutig zugeordnet werden. Die Häufigkeitsverteilung der gemessenen *EcoRII*-Bindungspositionen bezogen auf das 1.202-bp DNA-Molekül ist in Abb. 2b dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Enden der DNA-Schlaufen mit den Positionen der *EcoRII*-Erkennungsorte übereinstimmen. Das wiederum bestätigt die simultane spezifische DNA-Bindung von *EcoRII* an zwei Erkennungsorte.

Desweiteren bestimmten wir die Häufigkeit der vom Wildtyp-*EcoRII* und der Mutante V258N gebildeten Schlaufen in Gegenwart und Abwesenheit von Mg²⁺ (Abb. 2c). In Gegenwart von Mg²⁺ bildete der *EcoRII*-Wildtyp mit 18,4 % der gesamten DNA-Moleküle Schlaufenstrukturen, die Mutante V258N jedoch nur mit 3,3 %. Die Bildung von DNA-Schlaufen durch die Mutante V258N ist daher deutlich reduziert. Ohne Mg²⁺ bildeten 25,4 % der DNA-Moleküle induziert durch den *EcoRII*-Wildtyp Schlaufen und 6 % durch die Mutante V258N. Die Abnahme der Schlaufenbildung in Gegenwart von Mg²⁺ ist vermutlich auf die erhöhte Spezifität der DNA-Bindung durch *EcoRII* zurückzuführen.

Diese Daten offenbarten, daß der einzelne Austausch der Aminosäure Val²⁵⁸ von *EcoRII* gegen Asn die simultane Wechselwirkung des Enzyms mit zwei DNA-Erkennungsorten

deutlich einschränkte. Die verringerte DNA-Schlaufenbildung durch die Mutante V258N im Vergleich zum *EcoRII*-Wildtyp ist unabhängig von Mg^{2+} -Ionen.

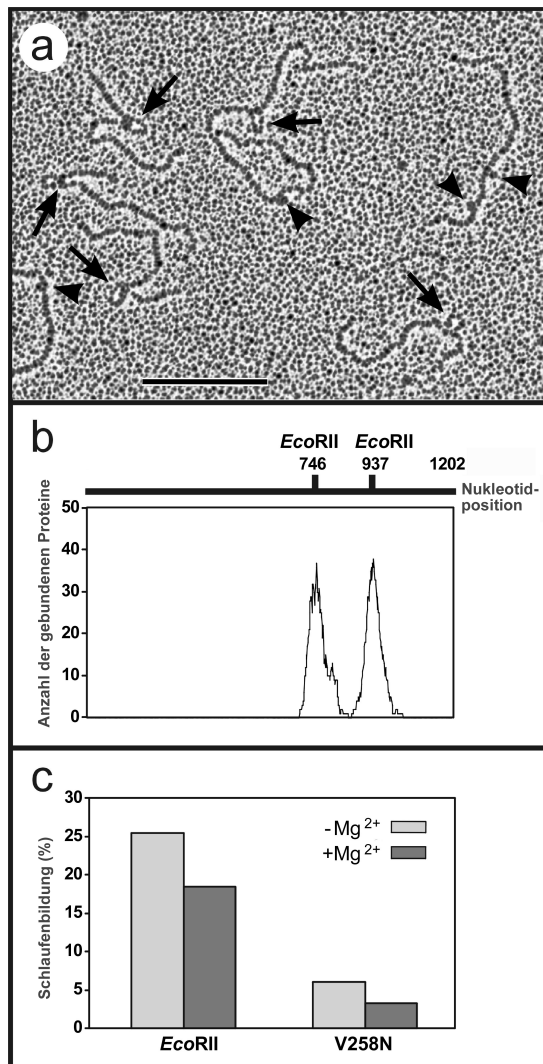


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Darstellung durch *EcoRII* induzierter Schlaufen in linearer DNA, die zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* enthält. a) Aufnahme von DNA-Protein-Komplexen in Abwesenheit von Mg^{2+} . Die Pfeile indizieren DNA-Schlaufen, die Pfeilköpfe zeigen auf *EcoRII*-Moleküle, die an die DNA gebunden sind, ohne DNA-Schlaufen hervorzurufen. Der Balken am unteren Bildrand entspricht einer Länge von 0,5 kb. b) Die Häufigkeitsverteilung der für *EcoRII* gemessenen Bindungspositionen. Das Ausmessen der Konturlängen von 90 DNA-Schlaufen bestätigte die Spezifität der durch *EcoRII* induzierten DNA-Schlaufenbildung. c) Anteil der DNA-Schlaufen an der Gesamtzahl von DNA-Molekülen in Gegenwart und Abwesenheit von Mg^{2+} (von einer definierten Fläche einer Aufnahme wurden ca. 400 Moleküle ausgewertet).

2.1.3 DNaseI-Footprint-Untersuchungen des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N

Um die Größe der DNA-Regionen zu definieren, welche die Enzyme *EcoRII* bzw. Mutante V258N spezifisch abdecken, führten wir DNaseI-Footprint-Untersuchungen mit einem DNA-Substrat durch, das zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* im Abstand von 82 bp aufwies. Die DNaseI-Footprint-Muster des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N an der

CCAGG- oder CCTGG-Sequenz von einer der beiden DNA-Erkennungssequenzen sind 16-18 bp lang (Abb. 3).

Mit zunehmender Konzentration der Enzyme *Eco*RII bzw. V258N wurde der Abbau der DNA durch DNaseI sowohl im A- als auch im T-Strang beider DNA-Erkennungssequenzen in ähnlichem Ausmaß blockiert. Die DNaseI-Footprints konnten für beide Enzyme bei einem Enzym/DNA-Erkennungssequenz-Verhältnis von 10:1 detektiert werden (Bahnen 6 und 10). Die DNaseI-Footprints, die aufgrund der spezifischen Bindung der Enzyme entstanden, waren annähernd symmetrisch in beiden Strängen einer DNA-Erkennungssequenz (nicht gezeigt). Die Mutante V258N verursachte das gleiche DNaseI-Footprint-Muster wie der *Eco*RII-Wildtyp. Das zeigte, daß die spezifische Erkennung der doppelsträngigen DNA-Erkennungssequenz durch den Aminosäureaustausch nicht verändert war.

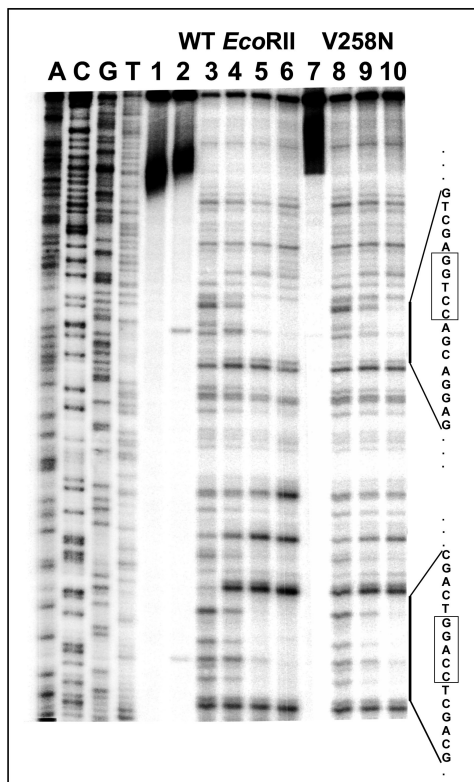


Abb. 3. DNaseI-Footprint des *Eco*RII-Wildtyps und der Mutante V258N an einem 282 bp langen DNA-Substrat, das zwei DNA-Erkennungssequenzen für *Eco*RII enthält. Die schwarzen Linien am Rand kennzeichnen die durch die Enzyme besetzten DNA-Regionen, deren Sequenzen in den Klammern angegeben sind. Die DNA-Erkennungssequenz von *Eco*RII ist eingerahmt. Bahn 1, DNA-Negativkontrolle; 2, DNA + *Eco*RII (Kontrollspaltung); 3, DNA + DNaseI Kontrolle; 4-6, Verhältnisse von *Eco*RII zu DNA-Erkennungssequenz = (1, 5, 10); 7, DNA + Mutante V258N; 8-10, Verhältnisse von Mutante V258N zu DNA-Erkennungssequenz = (1, 5, 10). Die Sequenzierungsreaktionen sind entsprechend der jeweiligen Kettenabbruchreaktion mit A, C, G und T indiziert.

2.1.4 Vergleich der DNA-Bindungs- und Spalteigenschaften sowie der Sekundärstrukturverteilungen von *EcoRII*-Wildtyp-Protein und Mutante V258N

Im Gegensatz zu der im DNaseI-Footprint als unverändert befundenen DNA-Erkennung durch die Mutante V258N, zeigten Gel-Shift-Versuche Veränderungen des V258N-DNA-Komplexes im Vergleich zum *EcoRII*-DNA-Komplex. Der von der Mutante V258N gebildete Komplex zeigte eine deutlich höhere elektrophoretische Mobilität als der des *EcoRII*-Wildtyps (Abb. 4a). Um die Spezifität der schneller migrierenden Komplexe zu überprüfen, führten wir Konkurrenzexperimente durch. Es zeigte sich, daß ein 1000-facher molarer Überschuß von unmarkierten, *EcoRII*-unspezifischen Oligonukleotidduplexen die Komplexbildung nicht reduzierte. Andererseits verschwanden die Komplexe vollständig infolge der Zugabe der gleichen Konzentration einer unmarkierten, *EcoRII*-spezifischen Kompetitor-DNA (nicht gezeigt). Aufgrund der erhöhten elektrophoretischen Mobilität vermuteten wir signifikante Abweichungen in der molekularen Zusammensetzung des V258N-DNA-Komplexes. Wir bestimmten die scheinbare Dissoziationskonstante $K_{D(app)}$, indem wir eine konstant niedrige Konzentration des DNA-Substrates mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Enzyms inkubierten. Der $K_{D(app)}$ -Wert beider Enzyme, des Wildtyps und der Mutante V258N, betrug 5 nM und zeigte, daß der Aminosäureaustausch die DNA-Substrataffinität nicht beeinflusste.

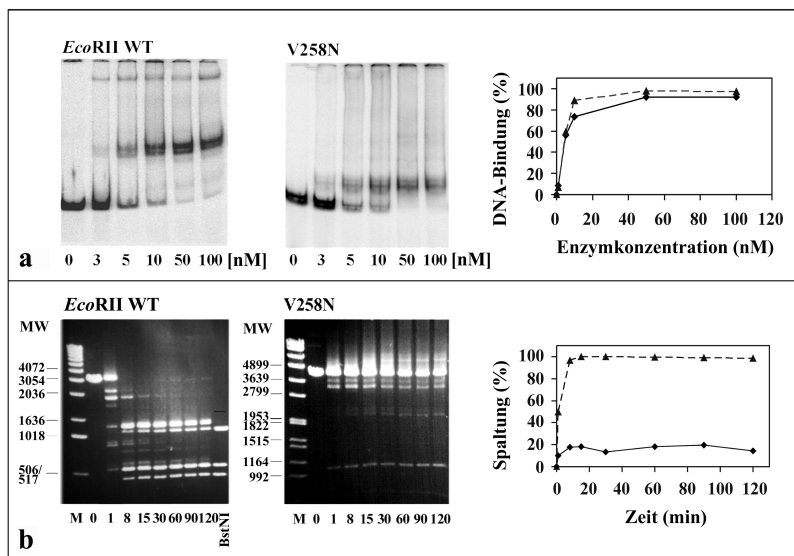


Abb. 4. a) Die scheinbaren Dissoziationskonstanten $K_{D(app)}$ bestimmt durch Gel-Shift-Versuche und b) die Effizienz der DNA-Spaltung durch *EcoRII*-Wildtyp und Mutante V258N bestimmt durch die Zeitabhängigkeit der Spaltung. Die Daten stellen je eins von vier unabhängigen Experimenten dar. Der gestrichelte Graph indiziert Werte für den Wildtyp, der durchgezogene Graph für die Mutante.

Die DNA-Spaltaktivität des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N untersuchten wir an linearisierter pBR322 dcm⁻ DNA. Im Gegensatz zur unveränderten DNA-Bindung (Abb. 4a), erreichte die Spaltaktivität der Mutante in *cis* nur 16 % der Wildtyp-Aktivität (Abb. 4b). Um zu

testen, ob die verminderte Spaltaktivität der Mutante V258N durch die gestörte Fähigkeit, kooperativ zu interagieren, bedingt war, verglichen wir zusätzlich die Spaltung in *trans* eines 30 bp langen Oligonukleotidduplexes mit einem DNA-Erkennungsort für *EcoRII* durch das Wildtyp-Enzym und die Mutante V258N. Die intermolekulare Spaltung (in *trans*) ist gegenüber der intramolekularen Spaltung (in *cis*) benachteiligt und sollte daher die Spaltung durch die Mutante V258N weiter verschlechtern. Wir fanden, daß die Mutante V258N - anders als das *EcoRII*-Wildtyp-Enzym - nicht in der Lage war, das 30bp DNA-Substrat, das die DNA-Bindung in *trans* erfordert, zu spalten (Daten nicht gezeigt). Daraus schlußfolgern wir, daß die Spaltung durch die Mutante V258N aufgrund der gestörten Kooperationsfähigkeit reduziert war.

Um zu zeigen, daß die eingeschränkte DNA-Spaltung der Mutante V258N auf den Aminosäureaustausch und nicht auf starke Veränderungen der Proteinfaltung zurückzuführen ist, nahmen wir CD-Spektren vom *EcoRII*-Wildtyp und der Mutante V258N auf. Die CD-Spektren beider Proteine wiesen keine bedeutenden Veränderungen in der Sekundärstrukturverteilung auf (Abb. 5). Die Anteile von α -helikalen und β -Faltblatt-Strukturen waren 27 und 23 % für den *EcoRII*-Wildtyp bzw. 31 und 10 % für die Mutante V258N. Die eingeschränkt Spaltung durch die Mutante V258N ist daher nicht auf eine veränderte Proteinfaltung zurückzuführen.

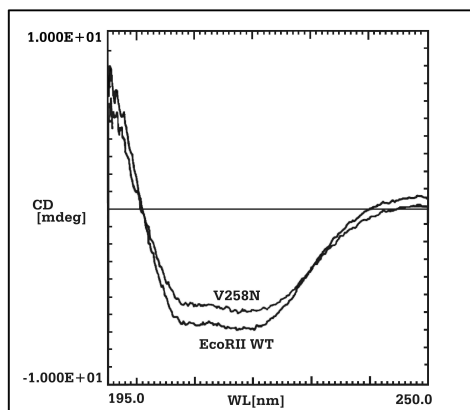


Abb. 5. CD-Spektren des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N. Beide Enzyme tragen einen N-terminalen His₆-Schwanz. Die Enzympräparationen waren von ≥ 95 %iger Reinheit. Die Enzymkonzentration war 0.29 mg/ml. Es wurden 10 unabhängige Messungen im Wellenlängenbereich von 250-195 nm durchgeführt.

2.1.5 Bestimmung der molekularen Masse und des oligomeren Status des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N durch zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Einsicht in die veränderte Zusammensetzung des V258N-DNA-Komplexes zu gewinnen, analysierten wir beide Enzyme, den *EcoRII*-Wildtyp und die Mutante V258N, mittels zwei-dimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese. In der denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese migrierten beide Enzyme als eine Hauptbande von 46 kD. Dies entspricht der molekularen Masse eines *EcoRII*-Monomers (Abb. 6a). Im Gegensatz dazu brachte die native Polyacrylamidgelelektrophorese des Wildtyps und der Mutante V258N Unterschiede in der Zusammensetzung beider Proteinlösungen ans Licht. Die scheinbaren molekularen Massen des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N im nativen Polyacrylamidgel wurden basierend auf einer logarithmischen Kalibrationskurve abgeschätzt (Abb. 6b).

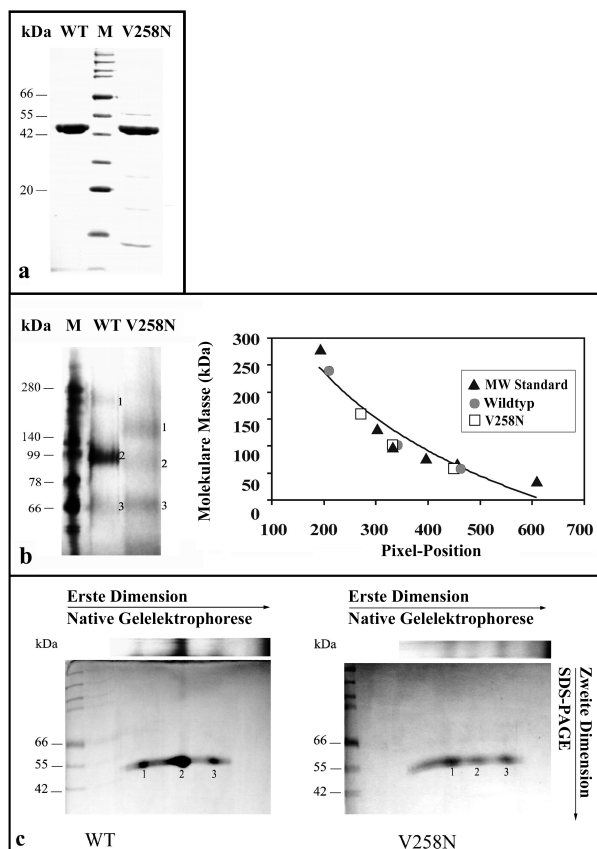


Abb. 6. Analyse des oligomeren Status und der molekularen Masse des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N. a) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N. b) Erste Dimension: Natives Polyacrylamidgel mit dem *EcoRII*-Wildtyp und der Mutante V258N (20 µg von jedem Protein) und die Kalibrationskurve. Die Banden der verschiedenen Proteinoligomeren (1-3) sind jeweils rechts von der Gelbahn angegeben. c) Zweite Dimension: Denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel der beiden Proteine, die zuvor in der ersten Dimension nativ aufgetrennt wurden. Die Standards für die molekulare Masse (Broad Range Marker, New England Biolabs) sind links von jedem Gel angegeben.

Der *EcoRII*-Wildtyp bestand hauptsächlich aus einer Komponente, die eine scheinbare molekulare Masse von 104,7 kD besaß, die mit dem Homodimer übereinstimmen könnte, und aus zwei weiteren Proteinkomponenten von ca. 240 kD (Bande 1) und 59,5 kD (Bande 3). Diese könnten einer tetrameren bzw. einer monomeren Proteinstruktur entsprechen. Die Lösung der Mutante V258N zeigte drei verschiedene Banden ähnlicher Intensität mit den scheinbaren molekularen Massen von 156,7; 101,5 und 59,1 kD. Diese drei Banden der Mutante V258N sind in Übereinstimmung mit den theoretischen molekularen Massen eines Proteintrimers, -dimers bzw. -monomers. Die *EcoRII*-Spezifität der beschriebenen Proteinbanden wurde mit einem polyklonalen Antiserum in Western Blot-Experimenten nachgewiesen (nicht gezeigt). Die durch die native Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden untersuchten wir in zweiter Dimension durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Fig. 6c). Damit bestätigten wir, daß die multiplen Banden des *EcoRII*-Wildtyps bzw. der Mutante V258N, die wir in der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese der ersten Dimension beobachtet hatten, im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel alle eine molekulare Masse entsprechend des *EcoRII*-Monomers besaßen. Als Konsequenz des Aminosäureaustauschs Val²⁵⁸ gegen Asn wurde die Enzymdimerisierung offensichtlich stark destabilisiert und das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht des Wildtyp-Enzyms mit deutlicher Bevorzugung des Dimers zu einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht hin verschoben.

2.1.6 Analytische Ultrazentrifugation von *EcoRII*-Wildtyp und Mutante V258N

Um den oligomeren Zustand des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante unter Gleichgewichtsbedingungen und die Affinität der Proteinuntereinheiten zueinander zu untersuchen, bestimmten wir die Konzentrationsabhängigkeit der durchschnittlichen molekularen Masse der Proteine durch Sedimentationsgleichgewichtsläufe in der analytischen Ultrazentrifugation. Abbildung 7 zeigt die extrapolierten Graphen der Konzentrationsabhängigkeit der durchschnittlichen molekularen Massen des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante unter der Annahme eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts. Während sich die molekulare Masse des *EcoRII*-Wildtyps in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht veränderte und mit 92 kD bestimmt wurde, war die molekulare Masse der Mutante V258N von der Proteinkonzentration abhängig. Im untersuchten Konzentrationsbereich von 35-100 µg/ml, veränderte sich die molekulare Masse von 66 auf 77 kD. Diese Werte liegen zwischen den theoretischen molekularen Massen des *EcoRII*-Monomers (46 kD) und des

Dimers (92 kDa) und unterstützen daher einen Gleichgewichtszustand zwischen monomerer und dimerer Form der Mutante V258N.

Unter Voraussetzung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts wurden die Dissoziationskonstanten des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N aus der Konzentrationsabhängigkeit der molekularen Masse berechnet. Die Dissoziationskonstante des *EcoRII*-Wildtyps betrug $2,89 (\pm 1,08)$ nM und die der Mutante V258N $0,99 (\pm 0,06)$ μ M. Das bedeutet eine 350-fache Abnahme der Dimerstabilität für die Mutante V258N gegenüber dem *EcoRII*-Wildtyp.

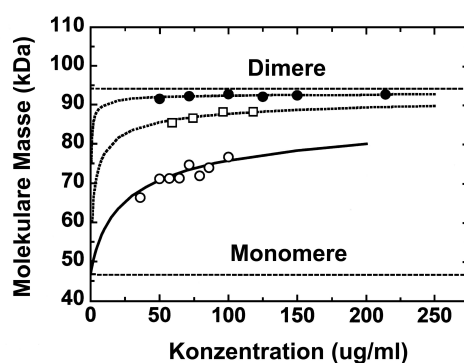


Abb. 7. Untersuchung der Abhängigkeit der molekularen Masse des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N von der Proteinkonzentration mittels analytischer Ultrazentrifugation. Die offenen Kreise stellen die Mutante V258N dar, die offenen Quadrate die Mutante R261S, die schwarzen Kreise den *EcoRII*-Wildtyp.

Wir untersuchten zusätzlich eine andere Mutante, und zwar die Mutante R261S. Die Aminosäure Arg²⁶¹ liegt innerhalb der DNA-Bindungsregion II von *EcoRII*, die zu den Aminosäuren 110-127 von SsoII Homologien aufweist. Arg²⁶¹ liegt nur drei Aminosäurepositionen weiter in C-terminaler Richtung von Val²⁵⁸ entfernt und wurde durch Ser ersetzt, welches in SsoII an der entsprechenden Position innerhalb der Homologiesequenz zu finden ist. Die Mutante R261S zeigte in der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese auffällige Banden, die wie bei der Mutante V258N den molekularen Massen eines *EcoRII*-Monomers und Dimers entsprächen (Daten nicht gezeigt). Die analytische Ultrazentrifugation bestätigte für die Mutante R261S ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht mit einer Dissoziationskonstante für die Proteindimerisierung von $77,8 (\pm 9,5)$ nM (Abb. 7). Das entspricht einer 25-fachen Destabilisierung des Proteindimers.

Die Sedimentationsgleichgewichtsläufe bestätigten die aus den DNA-Bindungs- und Gelelektrophorese-Experimenten abgeleitete Hypothese, daß die Substitution von Asn für Val²⁵⁸ zu einer substantiellen Destabilisierung der Proteindimerstruktur führte. Zusätzlich ist anzunehmen, daß auch Arg²⁶¹ in die Dimerisierung von *EcoRII* involviert ist.

2.2 Vergleichende kinetische Untersuchung der Spaltung superhelikaler Plasmid-DNA mit einer oder zwei DNA-Erkennungssequenzen durch *EcoRII* und *PspGI*

2.2.1 Kinetik der Spaltung von Plasmid-DNA mit einer DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII* und *PspGI*

Um herauszufinden, ob *EcoRII* pro Spaltereignis den DNA-Doppelstrangbruch an einem oder beiden DNA-Erkennungssequenzen katalysiert und um daraus auf die Anzahl der katalytischen Zentren pro *EcoRII*-Monomer zu schließen, verglichen wir den zeitlichen Verlauf der Spaltung von superhelikaler Plasmid-DNA mit einer (pKM1) bzw. zwei DNA-Erkennungssequenzen (pKM2) durch die Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* bzw. durch deren Homoisoschizomer *PspGI*. *PspGI* ist eine thermostabile, orthodoxe Typ II Restriktionsendonuklease aus *Pyrococcus*, die bei 85 °C optimale Aktivität und bei 37 °C noch 10 % ihrer Aktivität besitzt (New England Biolabs, Produktkatalog S. 52). Abb. 8 zeigt den zeitlichen Verlauf der Spaltung des Plasmids pKM1 mit *EcoRII* und *PspGI*. Aus der Spaltung des eine DNA-Erkennungssequenz enthaltenden Plasmides durch *EcoRII* resultierte ein lineares (L) und ein offen zirkuläres Produkt (OC), wobei das offen zirkuläre Produkt überwiegt. Offensichtlich produziert *EcoRII* in superhelikaler, eine DNA-Erkennungssequenz enthaltender Plasmid-DNA bevorzugt Einzelstrangbrüche an der DNA-Erkennungssequenz (Abb. 8), welche danach kein oder kein gutes Substrat für die Restriktionsendonuklease darstellen, so daß aus der offen zirkulären DNA im weiteren Verlauf der Reaktion kein lineares Produkt gebildet wird. Trotzdem entsteht in geringem Maße und vermutlich als Folge von *trans*-Interaktionen das lineare Produkt, obwohl in einem DNA-Konzentrationsbereich gearbeitet wurde, der die *trans*-Interaktionen stark zurückdrängt. Scheinbar können diese jedoch nie vollständig ausgeschlossen werden. Die DNA-Spaltung mit *EcoRII* wurde bei dem optimalen Verhältnis von DNA-Erkennungssequenzen und Enzym von 2:1 durchgeführt [42,46]. Die Spaltung des Plasmids pKM1 mit *PspGI* zeigte deutlich den für orthodoxe Typ II Restriktionsendonukleasen zu erwartenden Verlauf, die vollständige Überführung der superhelikalen pKM1-DNA in die lineare Form. Um Zwischenstufen der Reaktion identifizieren zu können, wurde die Reaktion mit *PspGI* bei einer Temperatur von

25 °C durchgeführt, was die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamte. Das hauptsächliche Spaltprodukt ist lineare Plasmid-DNA, als Intermediat entsteht offen zirkuläre DNA. Die Spaltung ist im Vergleich zu *EcoRII* wesentlich schneller und vollständig, wobei zu bemerken ist, daß die Reaktion mit *EcoRII* bei dessen optimaler Reaktionstemperatur von 37 °C durchgeführt und damit nicht verlangsamt wurde. Worin die Bedeutung der im Vergleich zu den orthodoxen Restriktionsendonukleasen sehr langsamen Spaltung durch *EcoRII* besteht, ist bislang nicht aufgeklärt. Eine mögliche Ursache wäre der vergleichsweise komplexere Reaktionsmechanismus der Typ IIE Restriktionsendonukleasen, die gleichzeitig mit zwei DNA-Erkennungssequenzen interagieren müssen.

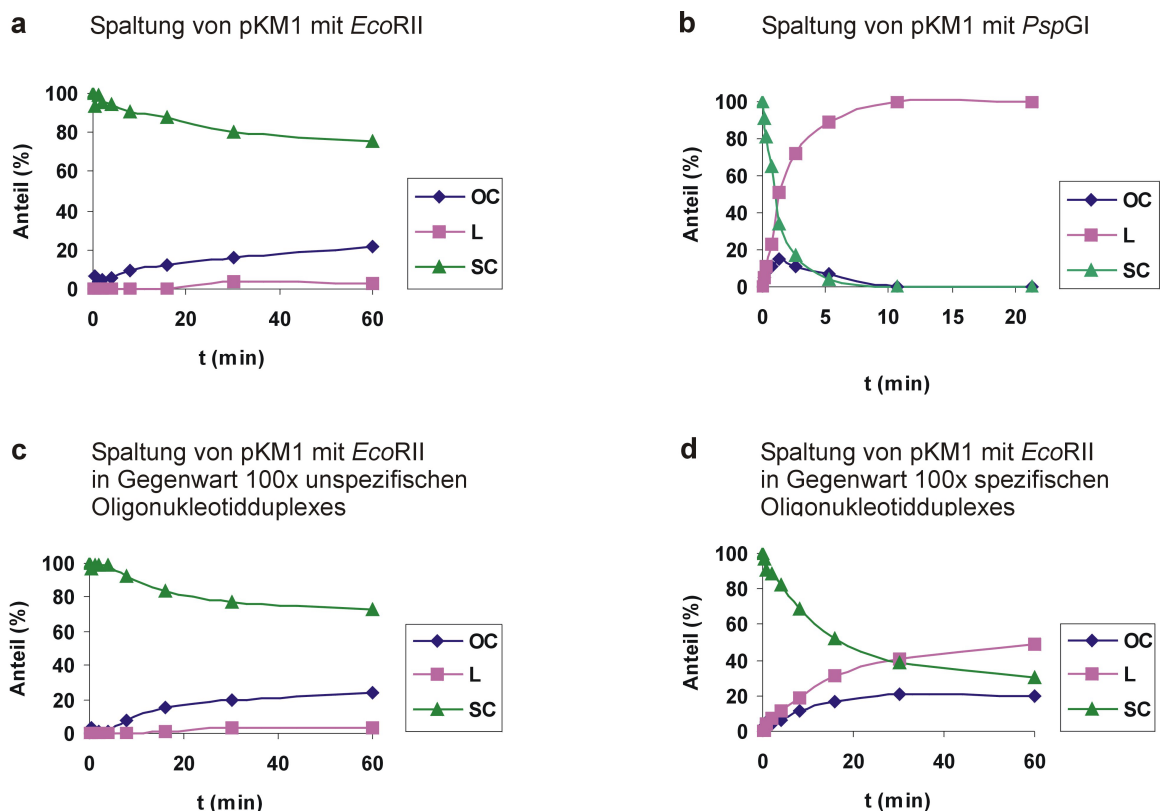


Abb. 8. Spaltung der Plasmid-DNA pKM1 mit einer DNA-Erkennungssequenz durch a) *EcoRII* und b) *PspGI*. Die Graphen zeigen die Anteile (%) des Substrates und der verschiedenen Spaltprodukte an der gesamten DNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit (min). c) Kontrolle der Stimulierung mit unspezifischen Oligonukleotidduplexen, d) Stimulierung der Spaltung durch *EcoRII* mit spezifischen 33-bp langen Oligonukleotidduplexen. OC, offen zirkuläre Plasmid-DNA; L, an einer DNA-Erkennungssequenz gesplattene, lineare Plasmid-DNA; SC, superhelikale Plasmid-DNA (Substrat).

Die für *EcoRII* durchgeführte Stimulierung der Spaltung der Plasmid-DNA pKM1 mit spezifischen Oligonukleotiden im 100-fachen Überschuß resultierte in einer gegenüber der unstimulierten Reaktion veränderten Produktzusammensetzung. Hauptprodukt ist nun die lineare Plasmid-DNA. Das offen zirkuläre Produkt entsteht in geringerem Maße und ist nicht Zwischenprodukt der *trans*-Interaktion von *EcoRII* und zwei DNA-Molekülen, da die Kurve (OC) kein intermediäres Maximum aufweist.

Die Daten illustrieren, daß für die effiziente Spaltung der DNA durch *EcoRII*, die gleichzeitige Interaktion mit zwei DNA-Erkennungssequenzen unabdingbar ist. Superhelikale Plasmid-DNA mit einer DNA-Erkennungssequenz wird durch *EcoRII* in Abwesenheit stimulierender Oligonukleotide nicht in beiden, sondern, wenn überhaupt, lediglich in einem Strang gespalten (DNA-nicking).

2.2.2 Kinetik der Spaltung von Plasmid-DNA mit zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* und *PspGI*

Die Spaltung der superhelikalen Plasmid-DNA pKM2 mit zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* im Abstand von 350 bp erzeugte bei einem stöchiometrischen und optimalen Verhältnis von DNA-Erkennungssequenzen und Enzym von 2:1 bis 4:1 hauptsächlich ein einziges lineares Spaltprodukt (L1, an einer der beiden doppelsträngigen Erkennungssequenzen gespaltene pKM2-DNA), (Abb. 9). Intermediär akkumulierte die offen zirkuläre Form der Plasmid-DNA (OC). In geringen Mengen wurde ein zweites lineares Produkt gefunden (L2, an beiden doppelsträngigen Erkennungssequenzen gespaltene pKM2-DNA), das wahrscheinlich auf *trans*-Interaktionen des Enzyms mit dem Ausgangssubstrat als auch mit den Produkten zurückzuführen ist, obwohl wiederum in einem DNA-Konzentrationsbereich gearbeitet wurde, der die *trans*-Interaktion gegenüber der *cis*-Interaktion stark zurückdrängt. Das zu L2 gehörende kleinere Spaltprodukt (die Differenz aus L1 und L2 mit der Länge von 350 bp wurde nicht berücksichtigt).

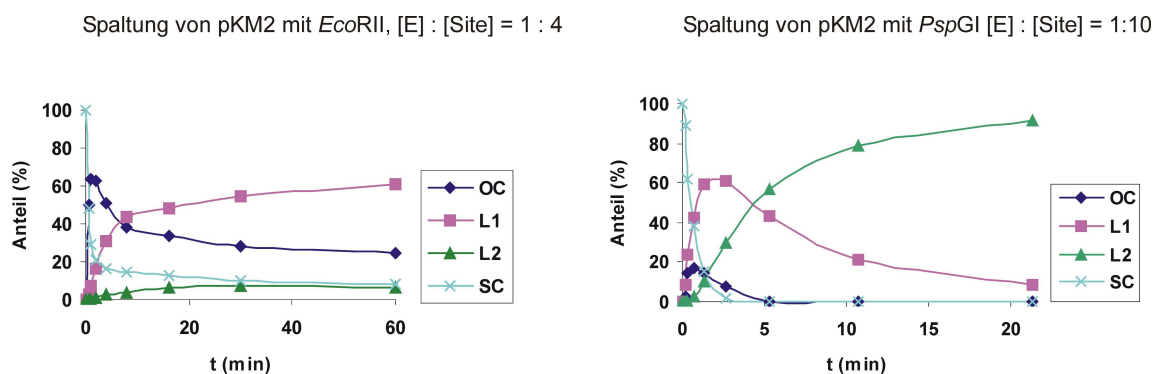


Abb. 9. Die Spaltung der superhelikalen Plasmid-DNA pKM2 mit zwei DNA-Erkennungssequenzen (Sites) durch *EcoRII* (links) und *PspGI* (rechts). Die stöchiometrischen Verhältnisse von Enzym : DNA-Erkennungssequenz ([E] : [Site]) sind in der Überschrift angegeben. Die Graphen zeigen die Anteile (%) des Substrates und der verschiedenen Spaltprodukte an der gesamten DNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit (min). Die unterschiedlichen Zeitachsen sind durch die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme begründet. OC, offen zirkuläre Plasmid-DNA; L1, an einer DNA-Erkennungssequenz gespaltene, lineare Plasmid-DNA; L2, an beiden Erkennungssequenzen gespaltene, lineare Plasmid-DNA; SC, superhelikale Plasmid-DNA (Substrat).

Da *EcoRII* für die erfolgreiche Spaltung der DNA die Interaktion mit zwei DNA-Erkennungssequenzen erfordert, schließen wir aus dem Resultat der pKM2-Spaltung, daß *EcoRII* pro Spaltereignis die Hydrolyse der zwei Phosphordiesterbindungen einer der beiden DNA-Erkennungssequenzen katalysiert, wobei als Zwischenstufe offen zirkuläre DNA durchlaufen wird. Die simultane Spaltung des DNA-Doppelstranges an beiden DNA-Erkennungssequenzen, bei der gleichzeitig zwei lineare Spaltprodukte auftreten müßten, wurde nicht beobachtet. Die Spaltung des zwei DNA-Erkennungssequenzen enthaltenden Plasmides pKM2 durch *PspGI* zeigt den zu erwartenden Reaktionsverlauf: Als Hauptprodukt entsteht das an beiden DNA-Erkennungssequenzen gespaltene lineare Produkt (L2). Intermediär akkumulieren nacheinander die offen zirkuläre Form der Plasmid-DNA (OC) und die an einer DNA-Erkennungssequenz gespaltene lineare Plasmid-DNA (L1). Im Gegensatz zu *EcoRII* kann *PspGI* die L1-DNA weiter verdauen zu L2-DNA, und die Spaltung durch *PspGI* ist im Gegensatz zu *EcoRII* auch unter sub-optimalen Bedingungen annähernd vollständig.

Die Kinetiken belegen, daß sich Spaltmechanismus und Spalteffizienz der Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* von denen der orthodoxen Restriktionsendonuklease unterscheiden. Das Spaltpattern der zwei DNA-Erkennungssequenzen enthaltenden Plasmid-DNA pKM2 durch *EcoRII* führte zu der Schlußfolgerung, daß *EcoRII* - zumindest im Fall von zirkulärer DNA mit zwei DNA-Erkennungssequenzen im Abstand von 350 bp - nur an einer der beiden an der Interaktion beteiligten DNA-Erkennungssequenzen beide DNA-Einzelstränge spaltet.

2.3 Photochemische Vernetzung von *EcoRII* mit den Basen der DNA-Erkennungssequenz zeigt ein asymmetrisches Vernetzungsmuster

2.3.1 Interaktion von *EcoRII* mit innerhalb der Erkennungssequenz modifizierten Oligonukleotidduplexen

Um direkte Kontakte von *EcoRII* zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz durch photochemische Vernetzung zu identifizieren, wurden zehn modifizierte Oligonukleotide entworfen, die 20 bp lang und in jeweils einer Position der DNA-Erkennungssequenz substituiert waren. Die Substitutionen bestanden entweder in 5-Iod-2'-desoxycytidin (Y) für C oder in 5-Iod-2'-desoxyuridin (X) für T, A oder G in der DNA-Erkennungssequenz. Als Folge der Substitutionen für A und G entstanden Fehlpaarungen. Daher untersuchten wir vor der photochemischen Vernetzung den Einfluß der Substitutionen auf das DNA-Bindungs- und Spaltverhalten von *EcoRII* mittels Gel-Shift- und Spaltversuchen.

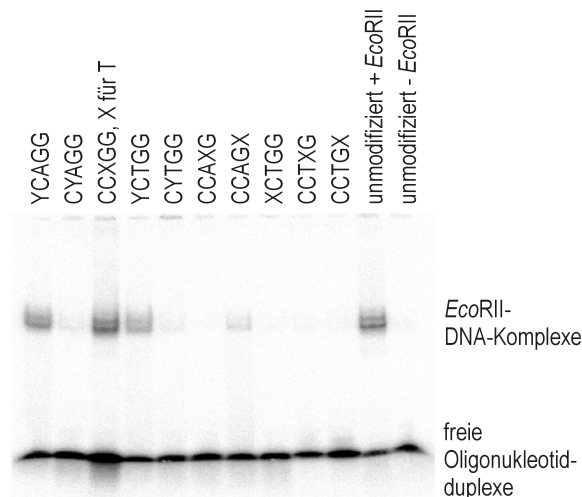


Abb. 10. Gel-Shift-Versuch mit den modifizierten Oligonukleotidduplexen und *EcoRII*. X = 5-Iod-2'-desoxyuridin, Y = 5-Iod-2'-desoxycytidin. Die Doppelbanden der *EcoRII*-DNA-Komplexe sind durch die Heterogenität der verwendeten Enzympräparation verursacht.

Die Gel-Shift-Experimente mit den ^{32}P -markierten, modifizierten Oligonukleotidduplexen zeigten, daß das Ersetzen von Basen der DNA-Erkennungssequenz durch Iodopyrimidine an einigen Positionen die Bindung von *EcoRII* behinderte (Abb. 10). *EcoRII* bildete Komplexe

mit den Oligonukleotidduplexen, in denen Y die 5'C in den beiden einzelnen DNA-Strängen ersetzte, und mit dem Oligonukleotidduplex, in dem X das zentrale T ersetzte. Weiterhin mußte *EcoR*II an das Oligonukleotidduplex binden können, in dem X das zentrale A ersetzte, da *EcoR*II dieses modifizierte Substrat erfolgreich spalten konnte (Abb. 11). Außerdem bildete das Enzym schwache Komplexe mit dem Oligonukleotidduplex, dessen 3'G im 5'CCAGG-Strang durch X ersetzt worden war.

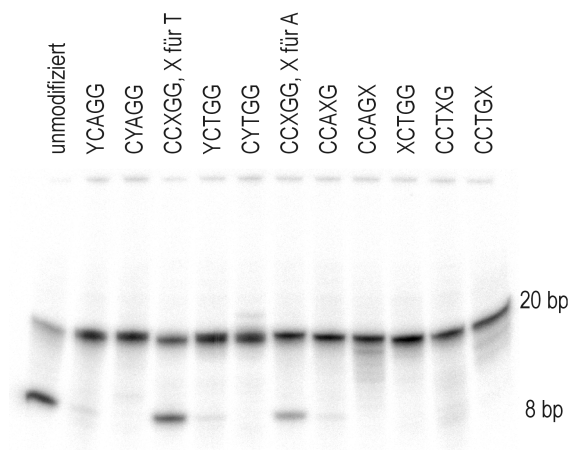


Abb. 11. Spaltung der modifizierten Oligonukleotidduplexe mit *EcoR*II. X = 5-Iod-2'-desoxyuridin, Y = 5-Iod-2'-desoxycytidin.

Die Spaltung der modifizierten Oligonukleotidduplexe durch *EcoR*II ergänzte und unterstrich die Ergebnisse der Gel-Shift-Versuche (Abb. 10). Bis auf die Oligonukleotidduplexe, in denen X das zentrale A oder T ersetzte, spaltete *EcoR*II keines der modifizierten Oligonukleotide effizient. Mit geringer Effizienz spaltete *EcoR*II die Oligonukleotidduplexe, in denen Y das jeweilige 5'C in beiden Strängen ersetzte, und das Oligonukleotidduplex, in dem X das interne G im 5'CCAGG-Strang ersetzte (5'CCAXG). Diese Ergebnisse bestätigen die extrem hohe Genauigkeit der DNA-Erkennung durch Restriktionsendonukleasen auch für die Restriktionsendonuklease *EcoR*II. Das Einfügen von Y anstelle der inneren C der DNA-Erkennungssequenz verursacht eine Hemmung der DNA-Bindung von *EcoR*II. Da die inneren C der DNA-Erkennungssequenz die Methylierungspositionen der korrespondierenden *EcoR*II-Methyltransferase darstellen, kann die Bindungshemmung durch die ähnliche Größe und Polarität von Methylgruppe und Iodatome erklärt werden. Die Basenfehlpaarungen, die durch das Ersetzen von G durch X entstanden, verringerten oder verhinderten sogar die DNA-Erkennung durch *EcoR*II. Im Gegensatz dazu, war *EcoR*II nicht empfindlich gegenüber Fehlpaarungen (X:T) oder Modifikationen (A:X) an dem zentralen A:T Basenpaar, da diese Substrate durch *EcoR*II gespalten wurden. Diese Daten ließen darauf schließen, daß die modifizierten Oligonukleotidduplexe, an die *EcoR*II nicht binden konnte, keine effiziente photochemische Vernetzung erlauben würden.

2.3.2 Photochemische Vernetzung von *EcoRII* mit der DNA-Erkennungssequenz

Die Basenanaloga X und Y sind bereits häufig erfolgreich in Studien zur spezifischen Bindung von Protein und DNA eingesetzt worden [52,53,54,55,56,57,58,59,60,67]. Beide Basenanaloga sind Null-Längen-Vernetzer, die durch UV-Licht der Wellenlänge 325 nm aktiviert werden. Nulllängen-Vernetzer beschränken Vernetzungen zu Aminosäuren des Proteins auf ein Minimum der Aminosäuren, die sich in einem dichten Abstand von 3-5 Å zur DNA befinden. Weiterhin vermeidet die Bestrahlung bei der Wellenlänge 325 nm, welche die Elektronen der Iod-Kohlenstoff-Bindung in X und Y anregt, die Anregung von anderen Nukleinsäure- und Protein-Chromophoren, was mögliche unspezifische Vernetzungsprodukte reduziert. X und Y bilden bevorzugt Verknüpfungen mit elektronenreichen Aminosäureseitenketten, wie Phe, Tyr, Trp, His und Met [67,68]. Außer dem Vorhandensein einer reaktiven Aminosäureseitenkette beeinflusst die Orientierung der reagierenden Gruppe die Ausbeute der Vernetzungsreaktion.

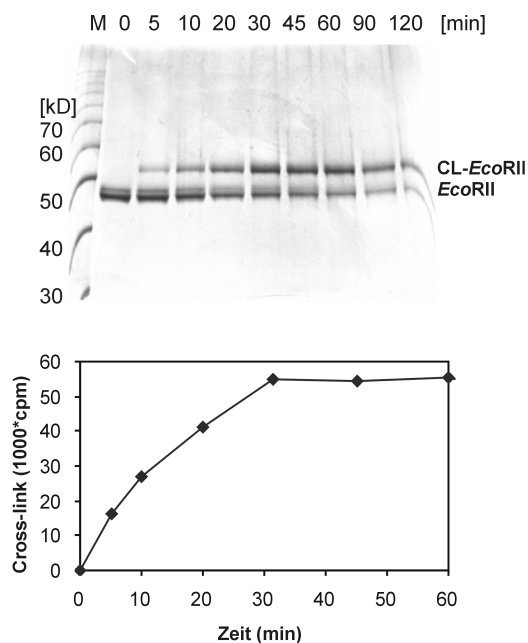


Abb. 12. Zeitverlauf der photochemischen Vernetzungsreaktion von *EcoRII* mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotidduplex, dessen 5'C im 5'CCAGG-Strang der DNA-Erkennungssequenz durch Y ersetzt war. Gleiche Volumina der photochemischen Vernetzungsreaktion wurden zu den oben angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die Doppelbanden sind durch die Heterogenität der verwendeten Enzympräparation verursacht. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind links vom Gel angegeben. Der Graph zeigt die Ausbeute an Vernetzungsprodukt in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer. Die Daten beruhen auf der quantitativen Auswertung des Gels mit Hilfe eines Phosphorimagers.

Wir untersuchten sowohl die modifizierten als auch das unmodifizierte Oligonukleotidduplex, an welche *EcoRII* binden konnte, auf die Bildung eines Vernetzungsprodukts nach Bestrahlung mit einem He/Cd-Laser der Wellenlänge 325 nm. Da die Bestrahlung in allen

Vernetzungsexperimenten bei 0 °C durchgeführt wurden, sind die gefundenen vernetzten Produkte aus dem DNA-Substrat und *EcoRII* gebildet und nicht aus DNA-Spaltprodukten und *EcoRII*, da *EcoRII* die DNA bei 0 °C nicht spaltet. Wir fanden, daß einzig das Oligonukleotidduplex, in dem Y das 5'C im 5'CCAGG-Strang ersetzte, mit einer Ausbeute von ca. 45 % bezogen auf die gesamte Proteinmenge mit *EcoRII* vernetzt werden konnte. Bestrahlungszeiten von 45-60 min ergaben die maximale Vernetzungsausbeute (Abb. 12). Längere Bestrahlungszeiten führten vermutlich als Folge von Photolysereaktionen zur Abnahme des Vernetzungsproduktes als auch des freien Proteins.

Der Austausch des zentralen A oder T gegen X erlaubte eine geringe Vernetzung von 5 % der gesamten Proteinmenge. Diese Vernetzungsprodukte waren im SDS-Polyacrylamidgel nur als radioaktive Bande detektierbar war, und wurden deshalb nicht weiter aufgearbeitet (Daten nicht gezeigt). Mit allen anderen modifizierten Oligonukleotidduplexen ließen sich keine kovalent vernetzten Protein-DNA-Komplexe erzeugen. Das ist sowohl auf die gestörte Bindung von *EcoRII* an diese Oligonukleotidduplexe als auch auf das Fehlen einer in enger Nähe zum photoaktiven Basenalogon befindlichen reaktiven Aminosäure in passender Orientierung zurückzuführen. Wie erwartet ergab das unmodifizierte Oligonukleotidduplex aufgrund der Abwesenheit einer photoaktiven Substitution kein Vernetzungsprodukt (Daten nicht gezeigt). Daher ist die photochemische Vernetzung von *EcoRII* mit dem Y an der 5'C-Position des 5'CCAGG-Stranges spezifisch. Abbildung 13 zeigt die für *EcoRII* gefundenen Vernetzungspositionen zur DNA-Erkennungssequenz.

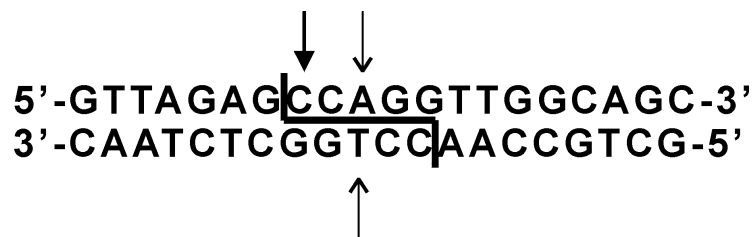


Abb. 13. Positionen photochemischer Vernetzungen von *EcoRII* mit Basen innerhalb der DNA-Erkennungssequenz - Vernetzungsmuster. Der dicke Pfeil indiziert eine Ausbeute an Vernetzungsprodukt von ca. 45 %, die dünnen Pfeile eine Ausbeute von unter 5 %. Die horizontale Linie kennzeichnet die DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII* und die vertikalen Linien symbolisieren den Spaltort.

Das Vernetzungsmuster ist asymmetrisch, da keine Vernetzung zum 5'C des 5'CCTGG-Stranges gefunden wurde. Um die Ursachen für diese Asymmetrie aufzudecken, untersuchten wir einerseits den Einfluß der die DNA-Erkennungssequenz flankierenden Basenpaare und andererseits den Einfluß des asymmetrischen zentralen A/T-Paares. Wir fanden kein Vernetzungsprodukt zum 5'C des T-Stranges, selbst wenn drei identische Basen die Erkennungssequenz sowohl im A- als auch im T-Strang flankieren (nicht gezeigt).

Weiterhin zeigte sich, daß *EcoRII* mit 5 % Ausbeute ein Vernetzungsprodukt zum 5'C der DNA-Erkennungssequenz in einem DNA-Substrat bildet, das eine T/T-Fehlpaarung anstelle des zentralen A/T-Paares und identische flankierende Basenpaare aufweist. Dieses Vernetzungsprodukt entstand jedoch nur in der Abwesenheit von Mg^{2+} und verschwand fast vollständig in Gegenwart von Mg^{2+} infolge der erhöhten DNA-Bindungsspezifität von *EcoRII* in Gegenwart von Mg^{2+} . Aufgrund dieser Beobachtungen schließen wir, daß die DNA-Erkennungssequenz flankierende Basenpaare nicht das asymmetrische Vernetzungsmuster von *EcoRII* verursachten.

Neben den modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotidduplexen untersuchten wir ein selbstkomplementäres Oligonukleotidduplex, das X für A oder T an der zentralen Position der Erkennungssequenz enthielt. Dieses Oligonukleotidduplex enthielt identische die DNA-Erkennungssequenz flankierende Basenpaare infolge der Selbstkomplementarität. Wird in diesem Oligonukleotidduplex das T durch X ersetzt, entsteht ein Vernetzungsprodukt mit einer Ausbeute von 5 %. Dieses Ergebnis stimmt mit dem für das Oligonukleotidduplex erhaltenen überein, dessen flankierende Basenpaare nicht identisch waren. Weiterhin untersuchten wir die Vernetzung des selbstkomplementären Oligonukleotidduplexes, wenn beide Basen, A und T, in der DNA-Erkennungssequenz durch X ersetzt wurden. Wenn *EcoRII* beide DNA-Stränge seiner DNA-Erkennungssequenz symmetrisch erkennt, dann sollte sich die Ausbeute der photochemischen Vernetzung verdoppeln, da *EcoRII* nun mit beiden Strängen Vernetzungen bilden könnte. Diese Verdopplung beobachteten wir jedoch nicht für *EcoRII* (nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, daß die Asymmetrie des zentralen A/T-Paares innerhalb der DNA-Erkennungssequenz für das asymmetrische Vernetzungsmuster von *EcoRII* mit den Basen der Erkennungssequenz verantwortlich ist. *EcoRII* scheint sich hinsichtlich der DNA-Erkennung von den Typ II Restriktionsendonukleasen zu unterscheiden, die im allgemeinen ihre DNA-Erkennungssequenzen symmetrisch erkennen und darum symmetrische Vernetzungsmuster zeigen sollten.

2.3.3 Identifizierung des photochemisch vernetzten *EcoRII*-Peptids

Um die Region in der *EcoRII*-Aminosäuresequenz zu analysieren, die die Vernetzung von *EcoRII* mit Y an der 5'C-Position des 5'CCAGG-Stranges ausbildete, wurden der vernetzte *EcoRII*-DNA-Komplex und das freie *EcoRII* durch Ausschneiden der jeweiligen Banden aus einem SDS-Polyacrylamidgel separiert. Das Gel wurde genutzt, um die jeweilige Reaktionsmischungen aufzutrennen. Das vernetzte *EcoRII* und das freie *EcoRII* wurden im

Gel mit Iodacetamid alkyliert und nachfolgend durch Trypsin verdaut. Die dabei entstandenen Peptidmischungen wurden extrahiert und die einzelnen Peptide jeder Mischung durch Reversed Phase HPLC aufgetrennt (Abb. 14). Wie die Chromatogramme zeigen, untersuchten wir die Absorption der Peptid-Fractionen bei 214, 260 und 280 nm, um durch Änderungen im Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm das Peptid erkennen zu können, welches mit der DNA vernetzt ist.

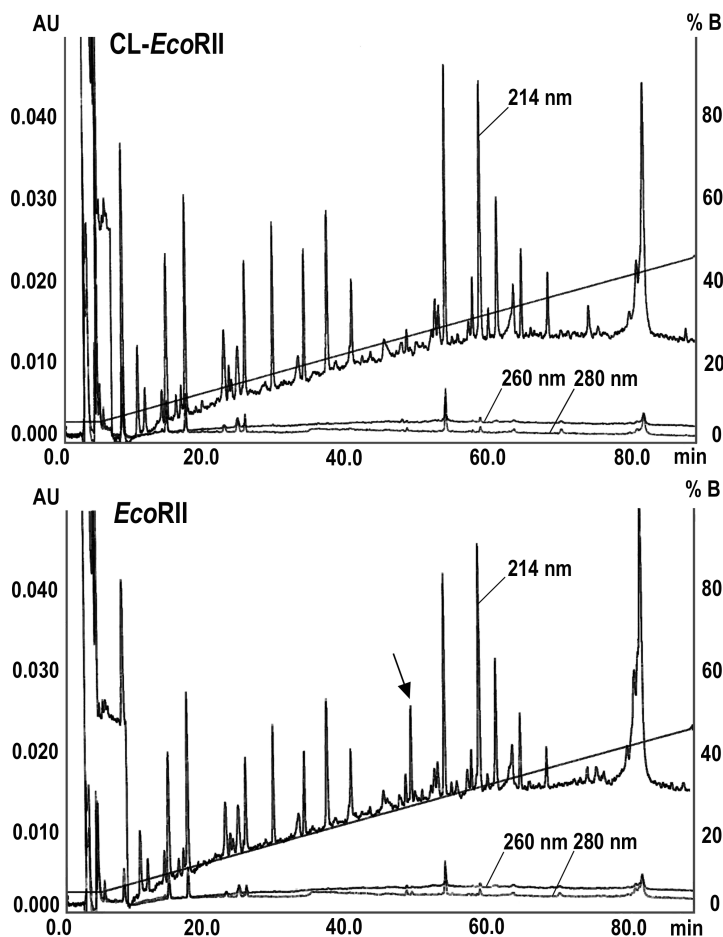


Abb. 14. RP-HPLC-Elutionsprofile des vernetzten *EcoRII* (CL-*EcoRII*, oberes Diagramm) und des freien *EcoRII* (unteres Diagramm). Die linke y-Achse zeigt die Absorption der Elutionsfraktionen (AU, Absorption Units) bei den Wellenlängen 214, 260 und 280 nm in Abhängigkeit von der Retentionszeit (min). Die Wellenlängen sind an die Graphen geschrieben. Die rechte y-Achse zeigt den Gradienten %B (0,1 % TFA/ Acetonitril) in A (0,1 % TFA/ Wasser). Der Pfeil kennzeichnet den einzigen Peak, in dem sich beide Chromatogramme unterscheiden.

Es zeigte sich, daß sich das Chromatogramm des vernetzten *EcoRII* lediglich im Fehlen eines einzigen Peaks von dem des freien *EcoRII* unterschied. Außerdem zeigten alle Peptide, die durch das RP-Material retardiert wurden, keine Unterschiede im Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm, was anzeigt, daß alle der aufgetrennten Peptide keine DNA enthielten. Der im Chromatogramm des vernetzten *EcoRII* fehlende Peak scheint daher dem vernetzten Peptid zu entsprechen, welches nicht durch die RP-HPLC isoliert werden konnte. Durch die radioaktive Markierung des vernetzenden Oligonukleotidduplexes konnte

jedoch verfolgt werden, daß das vernetzte Peptid vermutlich wegen der Hydrophilie der Nukleinsäure nicht an das Reversed Phase Material band.

Um das DNA-vernetzte Peptid zu identifizieren, wurde das zusätzliche *EcoRII*-Peptid weiter analysiert. Die Edman-Sequenzierung der ersten zehn Aminosäuren des zusätzlichen *EcoRII*-Peptids ermöglichte die Zuordnung dieses Peptids zur Aminosäuresequenz von *EcoRII*. Die Sequenz entsprach einem Peptid im N-terminalen Teil von *EcoRII*, nämlich den Aminosäuren 25-49: LSANDTGATG GHQVGLYIPS GIVEK. Die MALDI-Massenspektroskopie bestätigte die molekulare Masse dieses Peptids (nicht gezeigt). Diese Resultate lassen darauf schließen, daß ein Aminosäurerest des gefundenen Peptids die Vernetzung mit Y an der 5'C-Position des 5'CCAGG-Stranges vermittelte.

2.3.4 Mutationsanalyse der elektronenreichen Aminosäuren innerhalb des photochemisch vernetzten *EcoRII*-Peptids

Um die einzelne Aminosäure innerhalb des identifizierten *EcoRII*-Peptids zu finden, die die Vernetzung ausbildete, wurden all jene Aminosäuren des Peptids gegen Alanin ausgetauscht, die elektronenreich und deswegen Kandidaten für die Vernetzung mit halogenierten Pyrimidinen sind (Phe, Tyr, Trp, His und Met), [67,68]. Wir tauschten durch ortsspezifische Mutagenese His³⁶ gegen Ala und Gly und Tyr⁴¹ gegen Ala aus. Alle drei, einen His₆-Schwanz enthaltenden *EcoRII*-Mutanten wurden mittels Affinitätschromatographie zu 95 %iger Homogenität gereinigt. Die Gel-Shift-Versuche mit den drei *EcoRII*-Mutanten zeigten, daß die Mutante Y41A keine detektierbaren Protein-DNA-Komplexe bildete (Abb. 15). Die Mutanten H36A und H36G bildeten in unterschiedlichem Ausmaß einen Protein-DNA-Komplex, der die gleiche elektrophoretische Mobilität aufwies wie das *EcoRII*-Wildtyp Protein. Die DNA-Bindungsaffinität der Mutanten-Proteine H36G und H36A war zwei bzw. mehr als fünf Größenordnungen niedriger als die des Wildtyp-Enzyms ($K_D = 5 \text{ nM}$, Ref. [51]). Jedoch behielten die Mutanten-Proteine H36A und Y41A eine geringe Spaltaktivität. Daher müssen diese *EcoRII*-Mutanten in der Lage sein, ihr DNA-Substrat mit geringer Substrataffinität zu binden (Daten nicht gezeigt). Die *EcoRII*-Mutante H36G spaltete die DNA mit einer dem *EcoRII*-Wildtyp entsprechenden Aktivität (nicht gezeigt).

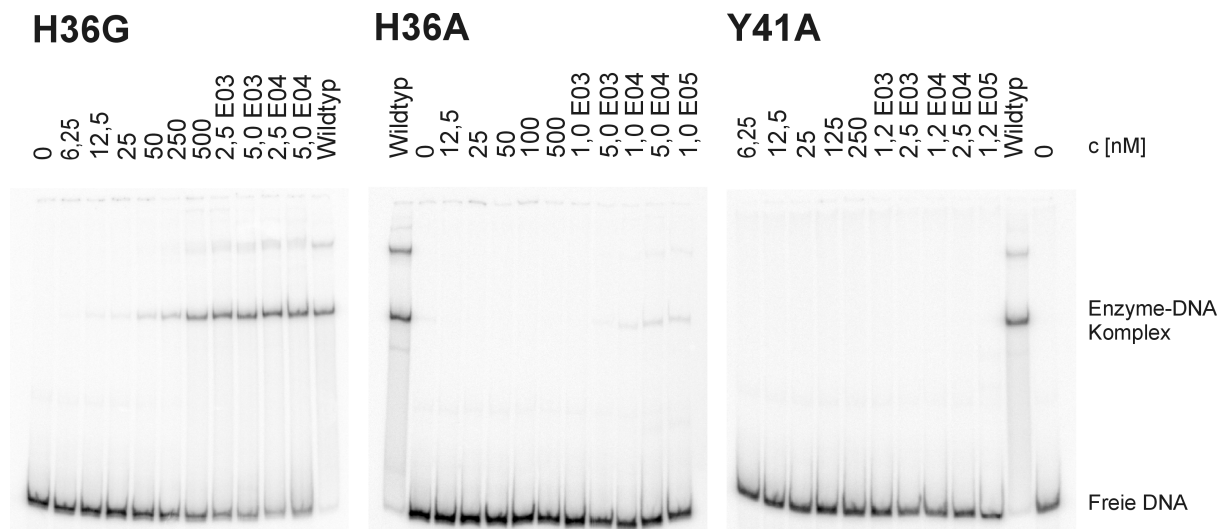


Abb. 15. Gel-Shift-Versuche mit den Mutanten H36G, H36A und Y41A von *EcoRII* und einem radioaktiv markiertem 191-bp PCR-Produkt, das eine DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII* enthält. Enzymkonzentrationen, oberhalb der einzelnen Bahnen der Gele. Wildtyp, Positivkontrollen mit *EcoRII* bei einer Enzymkonzentration von 50 μ M. Zum Vergleich, der K_D -Wert des Wildtyps beträgt 5 nM [51].

Weiterhin versuchten wir, die drei *EcoRII*-Mutanten photochemisch mit dem Oligonukleotidduplex zu vernetzen, das Y an der 5'C-Position im 5'CCAGG-Strang besaß (Abb. 16). Durch densitometrische Analyse der Banden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel fanden wir, daß die Mutante H36A zu 19 % und die Mutante H36G zu 33 % mit dem Oligonukleotidduplex vernetzt werden konnten. Im Gegensatz dazu bildete die Mutante Y41A überhaupt kein Vernetzungsprodukt. Auf Grundlage dieser Befunde schließen wir, daß Tyr⁴¹ von *EcoRII* die Aminosäure ist, welche die photochemische Vernetzung zum 5'C des 5'CCAGG-stranges der DNA-Erkennungssequenz vermittelt und deshalb eine Rolle in der basenspezifischen DNA-Erkennung des Enzyms spielen sollte.

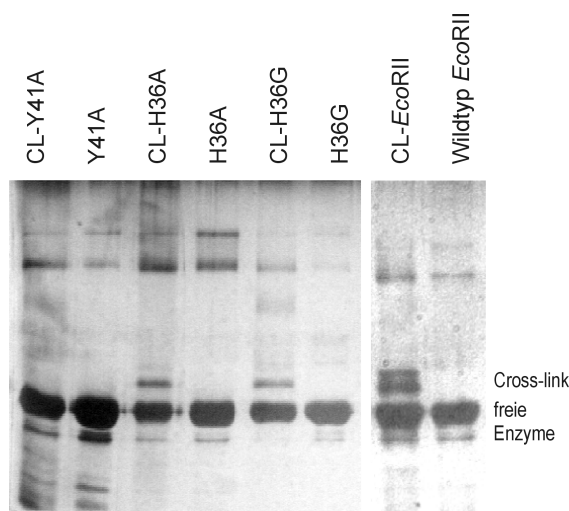


Abb. 16. 12 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der vernetzten Mutanten und des Wildtyps von *EcoRII*. Die Enzyme wurden mit dem Oligonukleotidduplex inkubiert, der an der Position des 5'C des 5'CCAGG-Stranges durch Y modifiziert war, und bestrahlt (CL-) oder nicht bestrahlt. Die Doppelbande des Wildtyps ist verursacht durch die Heterogenität der Enzympräparation.

2.4 Die Domänenorganisation von *EcoRII* wirft Licht auf die Evolution der Restriktionsendonukleasen

2.4.1 Limitierte Proteolyse von *EcoRII*

Auf der Suche nach funktionellen Domänen von *EcoRII*, verdauten wir *EcoRII* entweder mit der Protease Trypsin oder Chymotrypsin in Gegenwart und Abwesenheit von DNA unter limitierenden Bedingungen. Die limitierte Proteolyse verschafft Informationen über die Faltung des Proteins, da Regionen des Proteins, die dicht gefaltet sind, für die Proteasen weniger gut zugänglich sind als Verbindungsregionen oder Schleifen zwischen dicht gefalteten Regionen. Aus diesem Grund können sich dicht gefaltete Regionen des Proteins im Verlauf der Proteolyse als stabile Intermediate anreichern und nach Edman-Sequenzierung identifiziert werden.

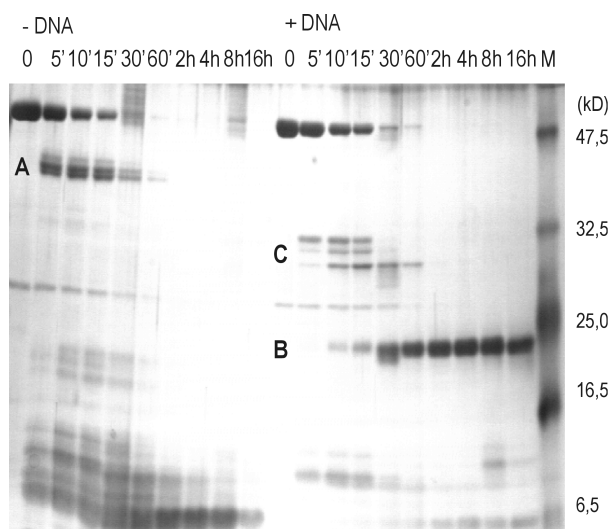


Abb. 17. Abbau von *EcoRII* mit Trypsin in Abwesenheit (links) und Gegenwart (rechts) spezifischer DNA. Die Abbauzeiten sind über den Gelbahnen angegeben. M, Molekulargewichtsmarker (Prestained Protein Marker, New England Biolabs). Ohne spezifische DNA entstanden intermediäre Produkte (A) von 33-34 kD. In Gegenwart spezifischer DNA entstand ein stabiles Produkt (B) von 23 kD und intermediäre Fragmente (C) von ca. 30 kD.

Der Verdau von *EcoRII* mit Trypsin ohne spezifische DNA zeigte ein intermediäres Cluster von Fragmenten mit ungefähren molekularen Massen von 33-34 kD (Fragmente A). Die

Abschätzung der molekularen Massen erfolgte aus dem SDS-Polyacrylamidgel unter Berücksichtigung der theoretisch zu erwartenden tryptischen Fragmente (Abb. 17). Die Gegenwart von spezifischer DNA im Verdau-Ansatz veränderte das durch Trypsin verursachte Spaltmuster von *EcoRII*. Es entstand nun ein stabiles Fragment mit einer molekularen Masse von ca. 23 kD (Fragment B) und intermediäre Fragmente von ca. 30 kD (Fragmente C).

Der Verdau von *EcoRII* mit Chymotrypsin setzte in Abwesenheit von spezifischer DNA ein stabiles Fragment von 26-27 kD (Fragment D) frei (Abb. 18). In Gegenwart spezifischer DNA beobachteten wir ein stabiles Fragment von ungefähr 21-22 kD (Fragment E). In Gegenwart *unspezifischer* DNA entsprachen beide proteolytischen Spaltmuster, das durch Trypsin sowie das durch Chymotrypsin hervorgerufene, jeweils dem in Abwesenheit von DNA entstandenen Spaltmuster. Daher sind die durch die Gegenwart *spezifischer* DNA zu beobachtenden Veränderungen des Spaltmusters direkt auf die spezifische DNA und deren Bindung an *EcoRII* zurückzuführen. Außerdem zeigte die Kontrolle mit *unspezifischer* DNA, daß die Proteolyse durch die Anwesenheit von DNA an sich nicht beeinträchtigt war.

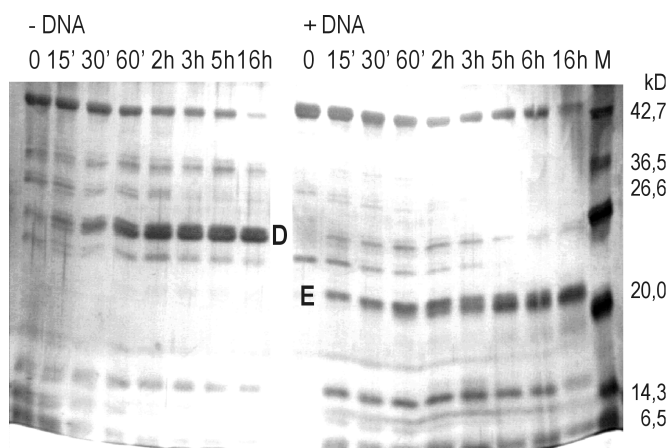


Abb. 18. Abbau von *EcoRII* mit Chymotrypsin in Abwesenheit (linke Seite) und in Anwesenheit (rechte Seite) spezifischer DNA. Die Abbauzeiten sind über den Gelbahnen angegeben. M, Molekulargewichtsmarker (Broad Range Marker, New England Biolabs). Die Molekulargewichte sind rechts neben dem Gel angegeben. In Abwesenheit spezifischer DNA entstand ein intermediär stabiles Fragment (D) von 26-27 kD. In Gegenwart spezifischer DNA akkumulierte ein Produkt von 21-22 kD (E).

Die N-terminale Edman-Sequenzierung der ersten zehn Aminosäuren identifizierte die proteolytischen Fragmente A und D, die in Abwesenheit von DNA entstanden, als C-terminale Fragmente von *EcoRII* (Abb. 19a). Die Fragmente B, C und E, die in Gegenwart spezifischer DNA akkumulierten, konnten dem N-Terminus von *EcoRII* zugeordnet werden (Abb. 19a). Die Zuordnung der proteolytischen Fragmente zur *EcoRII*-Aminosäuresequenz basiert auf den Ergebnissen der N-terminalen Sequenzierungen und auf den scheinbaren molekularen Massen der Fragmente, die durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

bestimmt wurden (Abb. 19b). Die N-terminale Hälfte eines *EcoRII*-Monomers widerstand der Proteolyse in Gegenwart spezifischer DNA, während die C-terminale Hälfte den Proteasen in Gegenwart spezifischer DNA leichter zugänglich wurde als in deren Abwesenheit. Die Ergebnisse führten zu dem Schluß, daß *EcoRII* aus mindestens zwei Domänen bestehen könnte, die annähernd der N- und der C-terminalen Hälfte des Proteins entsprechen. Da die Gegenwart spezifischer DNA insbesondere die N-terminale Hälfte von *EcoRII* widerstandsfähiger gegen die Proteolyse machte, ist anzunehmen, daß die N-terminale Hälfte in die spezifische DNA-Bindung involviert sein könnte.

a)

Fragment (M.)	N-terminale Sequenz	Mögliche Spaltpositionen in der <i>EcoRII</i> Sequenz
+ DNA		
B (23 kD)	MRGSHHHHHH	R192
E (21-22 kD)	MRGSHHH	Y183 L185 W189
- DNA		
A (33-34 kD)	ITRWGRGSPL WGRGSPLQDP GSPLQDPENT	R 98 R101 R104
D (26-27 kD)	SLQQAPVNHK	L170

b)

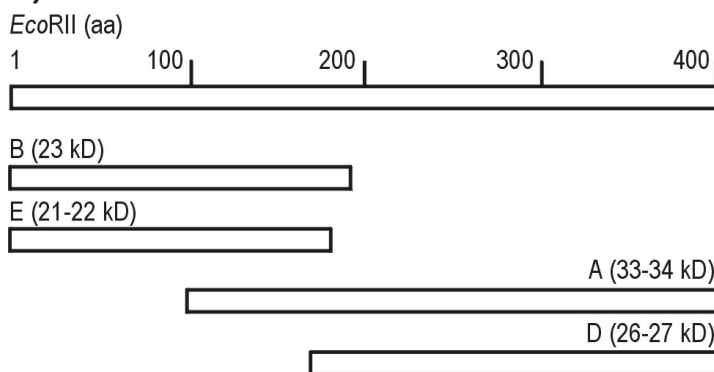


Abb. 19. a) Identifikation der proteolytischen Spaltfragmente durch Edman-Sequenzierung. Die mögliche Spaltpositionen in der *EcoRII*-Primärsequenz wurden basierend auf den Molekulargewichten aus den SDS-Polyacrylamidgelen bestimmt. **b)** Die Zuordnung der proteolytischen Fragmente zur *EcoRII*-Primärsequenz. Die Länge der Balken stellt die Länge der *EcoRII*-Primärsequenz (404 Aminosäuren), bzw. der proteolytischen Fragmente dar.

2.4.2 Klonierung der protease-resistenten Domänen von *EcoRII* und deren Reinigung

Um zu überprüfen, ob die identifizierten N- und C-terminalen proteolytischen Fragmente tatsächlich stabilen und funktionellen Domänen von *EcoRII* entsprachen, klonierten wir die N-terminalen Aminosäuren 4-192 und die C-terminalen Aminosäuren 173-404 von *EcoRII* getrennt (Abb. 19). Die beiden protease-resistenten Domänen von *EcoRII*, bezeichnet als *EcoRII*⁴⁻¹⁹² und *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴, wurden mit einem N-terminalen His₆-Schwanz exprimiert und gereinigt wie von Reuter *et al.* beschrieben [42].

Im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wanderte *EcoRII*⁴⁻¹⁹² in zwei Banden von 26 kD und 22 kD. Die Bande von 22 kD entspricht in etwa der theoretisch zu erwartenden molekularen Masse von 23 kD, die auf Basis der Aminosäuresequenz berechnet worden war. Die Bande von ca. 26 kD zeigte vermutlich infolge stark hydrophober Regionen auf der Oberfläche des trunkierten Proteins ein abnormes Laufverhalten. Die C-terminale Proteindomäne *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ migrierte im SDS-Polyacrylamidgel in einer Hauptbande von ca. 27 kD. Diese entspräche der auf Grundlage der Aminosäuresequenz theoretisch zu erwartenden molekularen Masse von 28 kD. Die Untersuchung der Proteinbanden im Western Blot mit α -*EcoRII*- und α -His-Antikörpern bestätigte die beobachteten beiden Proteinbanden von *EcoRII*⁴⁻¹⁹² und die eine von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ als *EcoRII* und His₆-Schwanz-spezifisch.

Zusätzlich zu diesen beiden protease-resistenten Domänen von *EcoRII*, versuchten wir die Aminosäuren 105-404 von *EcoRII* getrennt zu exprimieren und zu reinigen. Diese mutmaßliche protease-resistente Domäne entspräche dem tryptischen Proteolysefragment-Cluster A, der in Abwesenheit spezifischer DNA entstand. Die Reinigung dieser mutmaßlichen Domäne scheiterte jedoch an der Unlöslichkeit des Proteins und seiner Ablagerung im Zellpellet (nicht gezeigt). Das läßt vermuten, daß die Aminosäuren 105-404 von *EcoRII* keine stabile Domäne darstellen.

2.4.3 DNA-Bindungs- und Spaltungseigenschaften der protease-resistenten Domänen

Um zu bestimmen, ob die verkürzten Proteine spezifisch an die DNA binden würden, wurden Gel-Shift-Versuche durchgeführt. In diesen Gel-Shift-Versuchen bildete *EcoRII*⁴⁻¹⁹² zwei Komplexe mit spezifischer DNA, die eine höhere elektrophoretische Mobilität zeigten als die vom Wildtyp-Enzym gebildeten Komplexe. Die höhere elektrophoretische Mobilität resultiert

aus der niedrigeren molekularen Masse von $EcoRII^{4-192}$ (Abb. 20). Die beiden im Gel-Shift beobachteten Banden könnten entweder aus einer Inhomogenität der Enzympräparation oder aus der Dimerisierung der protease-resistenten Domäne in Gegenwart spezifischer DNA resultieren. Die DNA-Substrataffinität von $EcoRII^{4-192}$ und des Wildtyp-Enzyms unterschieden sich lediglich um eine Größenordnung. Die scheinbare Dissoziationskonstante $K_{D(app)}$ betrug ca. 26 nM für $EcoRII^{4-192}$ und ca. 1 nM für das Wildtyp-Enzym. Durch Konkurrenzexperimente mit einem 5000-fachen Überschuß von unmarkierter spezifischer bzw. unmarkierter unspezifischer DNA über ^{32}P -markierte Substrat-DNA wurde die Spezifität der Komplexe überprüft. Die Bande des $EcoRII^{4-192}$ -DNA-Komplexes verschwand in Gegenwart eines Überschusses von unmarkierter *spezifischer* Kompetitor-DNA, blieb jedoch in Gegenwart eines Überschusses unmarkierter *unspezifischer* DNA erhalten. Das wies nach, daß $EcoRII^{4-192}$ die DNA spezifisch bindet (nicht gezeigt) und bestätigt wiederum, daß die N-terminale Domäne von $EcoRII$ zur spezifischen DNA-Bindung des kompletten $EcoRII$ beiträgt. Im Gegensatz zu den gefundenen $EcoRII^{4-192}$ -DNA-Komplexen konnten wir für die protease-resistente Domäne $EcoRII^{173-404}$ keine Komplexbildung mit spezifischer DNA nachweisen, da der Anteil dieser Komplexe unter der Nachweisgrenze unserer Gel-Shift-Experimente lag.

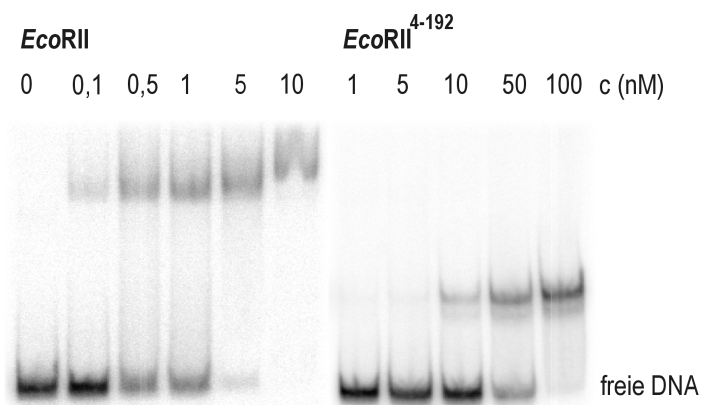


Abb. 20. Gel-Shift-Versuche mit $EcoRII^{4-192}$ und einem 191-bp PCR-Produkt, rechts. Gel-Shift-Versuche mit $EcoRII$ Wildtyp, links. Das PCR-Produkt enthielt einen Erkennungsort für $EcoRII$ und wurde radioaktiv markiert. Konzentration c (nM) des jeweiligen Proteins, über den Bahnen.

Obwohl $EcoRII^{4-192}$ spezifisch mit der DNA interagierte, war es nicht fähig, die DNA zu spalten (nicht gezeigt). Ganz im Gegensatz zu $EcoRII^{4-192}$ spaltete $EcoRII^{173-404}$ linearisierte pBR322 dcm⁻ DNA spezifisch und schneller als das Wildtyp-Enzym (Abb. 21). Die Zeitabhängigkeit der Spaltung von pBR322 dcm⁻ DNA zeigte, daß die Spaltung durch $EcoRII^{173-404}$ innerhalb einer Minute vollständig war, während das Wildtyp-Enzym die DNA selbst nach einer Stunde nicht vollständig gespalten hatte.

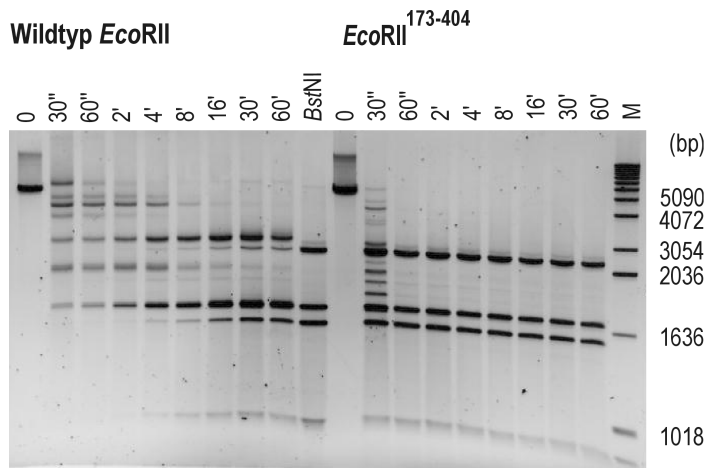


Abb. 21. Kinetik der Spaltung von pBR322 dcm⁻ DNA mit *EcoRII*-Wildtyp bzw. *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴. Reaktionszeiten, über den Bahnen. *Bst*NI, Positivkontrolle. M, Molekulargewichtsmarker (Marker X, Roche).

Die Spalteffizienz von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ ist der einer orthodoxen Typ II Restriktionsendonuklease vergleichbar, wie z.B. dem *EcoRII*-Isoschizomer *Bst*NI. Als Isoschizomer erkennt *Bst*NI die gleiche DNA-Sequenz wie *EcoRII*, spaltet jedoch hinter dem inneren C. Aufgrund der hohen Spalteffizienz vermuteten wir, daß die C-terminale Domäne *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ von *EcoRII* alle strukturellen und funktionellen Komponenten einer orthodoxen Typ II Restriktionsendonuklease besitzen könnte, die die DNA an einzelnen DNA-Erkennungssequenzen spezifisch spalten.

Um diese Vermutung zu testen, wählten wir die DNA des Phagen T3 als Substrat für eine vergleichende Spaltung durch *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ und durch das Wildtyp-Enzym. Es ist bekannt, daß *EcoRII* die DNA des T3-Phagen nicht spalten kann. Diese Spaltunfähigkeit ist Folge des seltenen Auftretens der *EcoRII*-DNA-Erkennungssequenz in der DNA des Phagen T3 (drei pro 38.740 bp) und der erforderlichen, gleichzeitigen Interaktion von *EcoRII* mit zwei DNA-Erkennungsorten [43,44]. Wir fanden, daß *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ die DNA des Phagen T3 vergleichbar einer orthodoxen Typ II Restriktionendonuklease (wie *Bst*NI) spaltete, während *EcoRII* die T3-DNA unter den gleichen Bedingungen nicht spaltete (Abb. 22). Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß die C-terminale Domäne von *EcoRII* die Endonuklease-Domäne des Proteins enthält. Weiterhin impliziert die spezifische und effiziente DNA-Spaltfähigkeit von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴, daß es die DNA spezifisch zu binden vermag. Darum muß *EcoRII* mindestens aus zwei Domänen bestehen, die spezifisch und unabhängig mit der DNA wechselwirken können. Da die C-terminale Domäne *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ doppelsträngige DNA ebenso spaltete wie eine typische dimere Typ II Restriktionsendonuklease, ist anzunehmen, daß *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ die DNA-Spaltung als Dimer ausführt.

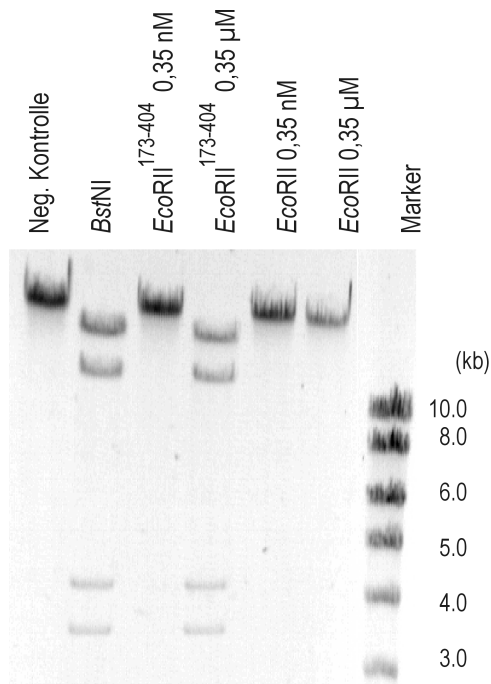


Abb. 22. Spaltung der DNA des Phagen T3 mit *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ bzw. *EcoRII*-Wildtyp. Der Name des jeweiligen Enzyms und dessen verwendete Konzentration sind über den Bahnen angegeben. Außen links, T3-DNA ohne Enzym, Negativkontrolle. *Bst*NI, Positivkontrolle. Der Molekulargewichtsmarker ist rechts gezeigt (Marker X, Roche).

2.4.4 Oligomerer Status der protease-resistenten Domänen *EcoRII*⁴⁻¹⁹² und *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴

Um die oligomere Natur der beiden protease-resistenten Domänen in Lösung und unter Gleichgewichtsbedingungen zu untersuchen, führten wir analytische Ultrazentrifugationsexperimente durch. Unter Voraussetzung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Oligomerenzustands der Proteine *EcoRII*⁴⁻¹⁹² und *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ bestimmt (Abb. 23). Im untersuchten Konzentrationsbereich lag die scheinbare molekulare Masse von *EcoRII*⁴⁻¹⁹² zwischen 37 und 40 kD. Diese Werte liegen zwischen den theoretischen molekularen Massen des Monomers (23 kD) und des Dimers (46 kD) und unterstützen daher ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht.

*EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich eine scheinbare molekulare Masse von 50 kD. Dieser Wert liegt ebenfalls zwischen den molekularen Massen für das Monomer (28 kD) und das Dimer (56 kD).

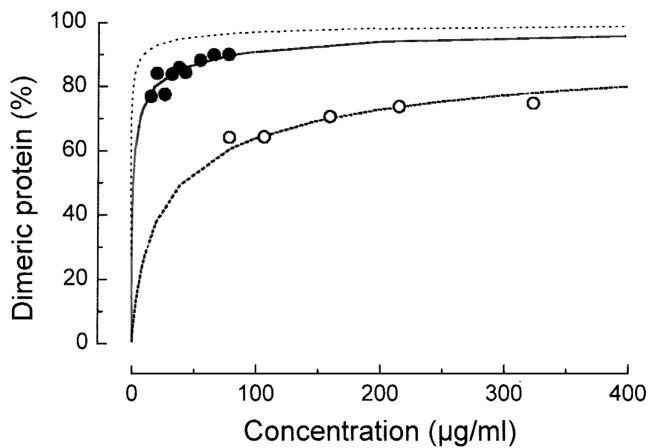


Abb. 23. Anteil (%) der dimeren Form von *EcoRII*⁴⁻¹⁹² bzw. *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ an der Gesamtprotein-konzentration (µg/ml). Diese Daten wurden mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bestimmt. Offene Kreise, Werte für *EcoRII*⁴⁻¹⁹²; schwarz ausgefüllte Kreise, Werte für *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴. Der Graph ohne eingezeichnete Werte zeigt zum Vergleich die entsprechende Abhängigkeit für den *EcoRII*-Wildtyp. Die Werte für den Wildtyp stammen aus der analytischen Ultrazentrifugation, die in Abb. 7 gezeigt wurde.

Die Dimer-Dissoziationskonstanten (K_D) wurden von der Konzentrationsabhängigkeit der molekularen Masse jeder der protease-resistenten Domänen berechnet. Die K_D -Werte der Proteindimerisierung waren für *EcoRII*⁴⁻¹⁹² $1,85 (\pm 0,19) \mu\text{M}$ bzw. $75,4 (\pm 9,1) \text{ nM}$ für *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴. Zum Vergleich, der *EcoRII*-Wildtyp bildet ein stabiles Dimer charakterisiert durch einen K_D -Wert von $2,89 (\pm 1,08) \text{ nM}$ (siehe Kapitel 1). Aufgrund des K_D von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴, nehmen wir an, daß *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ in Lösung bevorzugt als Dimer existiert, so wie nach der spezifischen Spaltung doppelsträngiger DNA vermutet. Das Dimer von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ war im Vergleich zum Wildtyp 26fach weniger stabil. Im Gegensatz zu *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ und basierend auf dem K_D für *EcoRII*⁴⁻¹⁹² existierte *EcoRII*⁴⁻¹⁹² bevorzugt als Monomer in Lösung und war 640-mal weniger stabil als der *EcoRII*-Wildtyp. Da *EcoRII*⁴⁻¹⁹² hauptsächlich monomer und *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ hauptsächlich dimer vorlag, vermuten wir, daß das *EcoRII*-Dimer vorwiegend durch Protein-Protein-Kontakte der beiden C-terminalen Domänen gebildet wird. Nichts desto trotz dimerisiert *EcoRII*⁴⁻¹⁹² möglicherweise in Gegenwart von spezifischer DNA wie in den Gel-Shift-Versuchen beobachtet wurde.

3 Diskussion

Die vorliegende Arbeit berichtet über Ergebnisse verschiedener Untersuchungen deren gemeinsames Ziel in der Aufklärung der Besonderheiten der DNA-Erkennung und Spaltung durch die Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* bestand. Im Verlauf dieser Untersuchungen fanden sich interessante Hinweise auf einen möglichen entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang von *EcoRII* mit Proteinen, die spezifisch und simultan mit zwei DNA-Erkennungssequenzen interagieren.

Die orthodoxen Typ II Restriktionsendonukleasen bestehen aus zwei identischen monomeren Untereinheiten, die jeweils die Hälfte aller spezifischen Protein-DNA-Kontakte zur jeweiligen palindromischen DNA-Erkennungssequenz vermitteln. Jede der beiden monomeren Untereinheiten besitzt ein katalytisches Zentrum, das die hydrolytische Spaltung einer einzigen Phosphordiesterbindung in einem Strang katalysiert. Die Restriktionsendonuklease *EcoRII* setzt sich ebenfalls aus zwei identischen monomeren Untereinheiten zusammen, muß aber im Gegensatz zu den orthodoxen Typ II Restriktionsendonukleasen zwei DNA-Erkennungssequenzen gleichzeitig binden, um die DNA entweder in *cis* oder in *trans* effektiv spalten zu können [12]. Diese Hypothese stützte sich auf i) die stöchiometrische Zusammensetzung des funktionell aktiven *EcoRII*-DNA Komplexes aus einem *EcoRII*-Dimer und zwei DNA-Erkennungsorten [42,46], und auf ii) die positive Substratkooperativität von *EcoRII*, aus der auf die Interaktion mit mehr als einem DNA-Erkennungsort und auf einen Reaktionsmechanismus geschlossen wurde, der eine Aktivierung des Enzyms einschließt [15,45]. Weiterhin iii) spaltet *EcoRII* die DNA unabhängig von der Unterbrechung der Kontinuität der zwischen den beiden DNA-Erkennungssequenzen liegenden DNA durch einen molekularen Block wie den Lac-Repressor [42]. Daher und wegen der Abnahme der Spalteffizienz von *EcoRII* mit steigendem Abstand der beiden DNA-Erkennungssequenzen in *cis* wurde vermutet, daß dem Zusammenbringen zweier DNA-Erkennungssequenzen durch *EcoRII* eher eine DNA-Schlaufenbildung zugrunde läge als ein Prozeß, der einen aktiven DNA-Transport (DNA-Translokation) mit einschließt, wie er zum Beispiel für Typ I und III Restriktionsendonukleasen postuliert wurde [3]. Außerdem verbrauchen letztere Enzyme

ATP [3], was für *EcoRII* nicht beobachtet wurde, und deswegen den aktiven DNA-Transport zusätzlich unwahrscheinlich erscheinen läßt.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die postulierte Bindung von *EcoRII* an zwei DNA-Erkennungssequenzen und die damit verbundene DNA-Schlaufenbildung mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie zu beweisen. Die vom *EcoRII*-Wildtyp gebildeten DNA-Schlaufen hatten einen Anteil von 18,4 % an den gesamten DNA-Molekülen. Das ist konsistent mit der Spalteffizienz von 23,8 %, die für ein DNA-Substrat mit zwei DNA-Erkennungssequenzen in gleichem Abstand (191 bp) bestimmt worden war [42]. In diesem Spaltexperiment waren die Reaktionsbedingungen so eingestellt, daß nahezu ausschließlich die Reaktion in *cis* möglich war. Darum wurde die niedrige Spalteffizienz von 23,8 % auf eine reduzierte Stabilität der DNA-Schlaufen und auf eine reduzierte Wahrscheinlichkeit der DNA-Schlaufenbildung infolge des zunehmenden Abstandes der beiden DNA-Erkennungssequenzen zurückgeführt [42]. Die auf ein Drittel verringerte DNA-Schlaufenbildung durch die Mutante V258N im Vergleich zum *EcoRII*-Wildtyp macht deutlich, daß die DNA-Schlaufenbildung durch *EcoRII* ein intaktes Proteindimer voraussetzt. Die restlichen beobachteten DNA-Schlaufen, die die Mutante V258N zu bilden vermochte, sind vermutlich auf einen Anteil der dimeren Form der Mutante V258N zurückzuführen. Die Spalteffizienzen der beiden Enzyme reflektieren die Häufigkeiten der DNA-Schlaufenbildung durch den *EcoRII*-Wildtyp und die Mutante V258N. Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie veranschaulichen, daß der Komplex aus *EcoRII*-Dimer und zwei DNA-Erkennungssequenzen in jedem Fall ein Reaktionsintermediat und höchstwahrscheinlich die aktive Form des Komplexes darstellt. Bisher wurde die DNA-Schlaufenbildung außer für *EcoRII* ausschließlich für die Typ IIE Restriktionsendonuklease *NaeI* gezeigt [69]. Die DNA-Schlaufenbildung ist weiterhin für die Typ IIF Restriktionsendonuklease *Cfr10I* und für die ungewöhnlich große, in Lösung monomere Restriktionsendonuklease *Sau3AI* nachgewiesen [49,70] und anhand kinetischer Untersuchungen für die Typ IIF Restriktionsendonuklease *SfiI* postuliert worden [71]. Trotz der Gemeinsamkeit, zwei DNA-Erkennungssequenzen zu erfordern und DNA-Schlaufen zu bilden, unterscheiden sich die Typ IIF Restriktionsendonukleasen von *EcoRII* und *NaeI* hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus vier Untereinheiten (Homotetramere) und der konzertierten Spaltung an beiden DNA-Erkennungssequenzen [49,72]. Die Fähigkeit der Typ IIE und IIF Restriktionsendonukleasen, spezifische DNA-Schlaufen zu bilden, ist auch für andere DNA-bindende Proteine beschrieben. Zu diesen gehören unter anderem DNA-Rekombinasen, DNA-Reparaturenzyme und Transkriptionsfaktoren [8].

Die DNaseI-Footprinting Muster von *EcoRII* sind auf beiden Strängen einer DNA-Erkennungssequenz symmetrisch und bedecken 16-18 bp. Aufgrund der Symmetrie der DNaseI-

Footprints auf beiden DNA-Strängen scheint weder der *EcoRII*-Wildtyp noch die Mutante V258N zwischen dem A oder T-Strang zu unterscheiden. Das stimmt mit der Tatsache überein, daß *EcoRII* T/T bzw. A/A-Basenfehlpaarungen an der zentralen Position der DNA-Erkennungssequenz akzeptiert [73], und daß die Orientierung der DNA-Erkennungssequenzen die Spaltaktivität von *EcoRII* nicht beeinflußt [42]. Die Ergebnisse der photochemischen Vernetzung von *EcoRII* mit den Basen der DNA-Erkennungssequenz deckten jedoch auf, daß das zentrale A/T-Paar durchaus asymmetrische Kontakte des Enzyms zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz nach sich zieht. Diese Asymmetrie konnte mit den DNaseI-Footprinting Untersuchungen nicht detektiert werden.

Die Größe der durch *EcoRII* geschützten DNA-Region wurde früher bereits zu 21 ± 1 bp mittels Dissoziationskinetiken des an ein synthetisches, konkatameres Oligonukleotidduplex gebundenen *EcoRII*-Enzyms abgeschätzt [74]. Die Daten des DNaseI-Footprints reduzieren die durch *EcoRII* bedeckte DNA-Region auf 16-18 bp. Die Mutante V258N zeigte im Vergleich zum *EcoRII*-Wildtyp keine Unterschiede hinsichtlich der DNA-Erkennung, was bedeuten könnte, daß entweder eine monomere Untereinheit hinreichend ist, um an eine doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz zu binden, oder daß die überwiegend monomere Mutante V258N in Gegenwart von DNA-Erkennungssequenzen dimerisiert, insbesondere im Falle der für die DNaseI-Footprints notwendigen hohen Enzymkonzentrationen. Die letztere Situation wäre mit dem DNA-Bindungsverhalten der monomeren Typ IIS Restriktionsendonukleasen *FokI* und *MboI* vergleichbar, die in Gegenwart spezifischer DNA und Mg^{2+} oder Ca^{2+} dimerisieren und mit zwei DNA-Erkennungssequenzen interagieren, um die DNA effizient zu spalten [11,75]. Phosphordiesterbindungen der DNA-Substrate, die bezüglich der Spaltung durch DNaseI Hypersensitivität zeigten, also besonders häufig von der DNase gespalten wurden, reflektieren möglicherweise strukturelle Deformationen der DNA, wie z.B. Biegung oder Knicke, infolge der Bindung des Enzyms an die DNA. Solche strukturellen Deformationen werden als mögliche strukturelle Basis für die kooperative Bindung an zwei DNA-Erkennungssequenzen mit kleinem Abstand diskutiert [76].

Der monomere Charakter der Mutante V258N wurde unabhängig durch die Bestimmung der molekularen Masse und die Untersuchung des oligomeren Status mittels analytischer Ultrazentrifugation sowie zwei-dimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen. Damit konnte überprüft werden, daß die Mutante V258N in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht existiert, das konzentrationsabhängig ist. Im Vergleich zum *EcoRII*-Wildtyp ist das Dimer der Mutante V258N 350fach destabilisiert. Die Mutante R261S, deren Aminosäureaustausch nur drei Aminosäuren weiter in C-terminaler Richtung liegt, zeigte ebenfalls eine verringerte Dimerstabilität. Allerdings war die Dimerstabilität in diesem Fall nicht so gestört wie für die

Mutante V258N. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluß, daß beide Aminosäurereste, Val²⁵⁸ und Arg²⁶¹, zu einer mutmaßlichen Kontaktfläche der monomeren *EcoRII*-Untereinheiten im Dimer beitragen, und daß vielfältige Wechselwirkungen von Aminosäureresten für die Oligomerisierung verantwortlich sind. Die Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation bestätigten außerdem, daß *EcoRII* in Lösung ein stabiles Dimer bildet, was dieses Enzym deutlich von den tetrameren Typ IIF Restriktionsendonukleasen wie *Cfr10I* und *SfiI* abgrenzt.

Die bestimmten molekularen Massen und der oligomere Status der Mutante V258N unterstützen unsere Vermutung, daß die Mutante V258N als Monomer spezifisch an die DNA bindet, während der *EcoRII*-Wildtyp ausschließlich als Dimer mit der DNA interagiert. Allerdings kann für die Mutante V258N bei hohen Enzymkonzentrationen auch der Komplex des Dimers mit der DNA beobachtet werden. Eine Parallele zu diesen Ergebnissen findet sich bei der Typ IIE Restriktionsendonuklease *NaeI*, deren proteolytisches Fragment (aa 169-317) in Lösung monomer vorliegt, aber weiterhin fähig ist, mit spezifischer DNA Komplexe zu bilden [77].

Die Spaltaktivität der Mutante V258N an linearisierter pBR322-DNA reduzierte sich auf 16 % der Spaltaktivität des *EcoRII*-Wildtyps. Da die DNA-Bindungsaffinität ebenso wie die Sekundärstrukturverteilung der Mutante V258N nicht verändert war, ist anzunehmen, daß die Destabilisierung des Proteindimers für die verringerte Fähigkeit der Mutante kooperativ zu interagieren, verantwortlich war. Weiterhin war die Mutante V258N nicht in der Lage, Oligonukleotide mit einer DNA-Erkennungssequenz in *trans* zu spalten. Vermutlich ist das eine Folge der schwachen Protein-Protein-Interaktion der Monomere der Mutante V258N, die zwar eine restliche Spaltung der pBR322 DNA in *cis* zuließ, aber für die Bildung eines stabilen Komplexes mit zwei unabhängigen DNA-Substratmolekülen nicht hinreichend zu sein schien. Diese Daten unterstützen unsere Hypothese, daß ein Komplex aus einem *EcoRII*-Monomer und einer DNA-Erkennungssequenz katalytisch inaktiv wäre, und daß die Dimerisierung essentiell mit der Spaltung verwoben ist. Diese These widerspricht dem von Karpova *et al.* veröffentlichten Modell, das einen Komplex aus einem *EcoRII*-Monomer und einer DNA-Erkennungssequenz als katalytisch aktiven Komplex vorschlägt [78].

Die monomere Mutante von *EcoRII* unterscheidet sich von den bisher bekannten Monomeren von *EcoRI* und *Cfr10I* hinsichtlich ihres DNA-Bindungs- und Spaltverhaltens [49,79]. Die aktiven monomeren Formen des *EcoRI*-Wildtyps und dessen Mutante N199H erkennen und spalten einzelsträngige DNA [79]. Beide Enzyme behielten jedoch eine restliche Fähigkeit zu dimerisieren, die von der Elektrolytkonzentration abhing. Eine andere monomere *EcoRI*-

Mutante (L158D) war vollkommen unfähig zu dimerisieren und zeigte lediglich eine unspezifische DNA-nicking Aktivität (J. Alves, pers. Mitteilung). Diese Daten betonen, daß die spezifische DNA-Erkennung und -Spaltung durch eine orthodoxe Typ II Restriktionsendonuklease gewöhnlich eng mit der Dimerisierung verknüpft sind. Im Gegensatz dazu ist die monomere Mutante V258N von *EcoRII* in der Lage, die doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz weiterhin spezifisch zu erkennen. Für die monomere Mutante der Typ IIF Restriktionsendonuklease *Cfr10I*, die in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, wurde vorgeschlagen, daß sie die doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz nur in der dimeren Form erkennt, aber als Monomer die DNA-Bindungsfähigkeit verliert [49]. Daher ist die *EcoRII*-Mutante V258N die erste beobachtete monomere Mutante einer Restriktionsendonuklease, die die Eigenschaft beibehält, die doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz spezifisch zu erkennen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß ein Monomer der homodimeren *EcoRII* Restriktionsendonuklease allein spezifisch an die doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz binden kann. Für die Interaktion des *EcoRII*-Dimers mit zwei doppelsträngigen DNA-Erkennungssequenzen gäbe es folgende Möglichkeiten. Erstens, ein Monomer könnte alleine eine DNA-Bindungstasche für eine DNA-Erkennungssequenz bilden, zu der die durch membran-gebundene Peptidbibliotheken gefundenen DNA-bindenden Regionen I und II beitragen könnten. Zweitens, zwei Monomere von *EcoRII* dimerisieren an der DNA, wobei je ein Monomer jeweils die Hälfte der Kontakte zu den beiden DNA-Erkennungssequenzen ausbildete, und jeweils die beiden DNA-bindenden Regionen I und I' sowie II und II' oder I und II' sowie I' und II miteinander eine DNA-Bindungstasche formten. In jedem Fall aber ist für die DNA Spaltung durch *EcoRII* die Existenz eines intakten Dimers unabdingbar.

Würde ein *EcoRII*-Monomer allein, unter Beteiligung der DNA-bindenden Regionen I und II, spezifisch eine doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz binden, dann sollten sich in einem *EcoRII*-Monomer auch die strukturellen Voraussetzungen für die Spaltung beider Stränge einer DNA-Erkennungssequenz finden. Dazu müßten entweder zwei katalytische Zentren pro Monomer existieren wie z.B. für die monomere Homing-Endonuklease PI-SceI gezeigt [80], oder aber ein katalytisches Zentrum pro Monomer katalysierte nacheinander die Spaltung in beiden Strängen, womit eine eher unwahrscheinliche, umfangreiche Umordnung des Enzyms verbunden sein müßte, da die Spaltpositionen von *EcoRII* in den beiden Strängen einer doppelsträngigen DNA-Erkennungssequenz 5 bp voneinander entfernt liegen. In den beiden vorgenannten Fällen könnten theoretisch die vier Einzelstränge beider DNA-Erkennungssequenzen gespalten werden. Trotzdem wäre eine Interaktion mit einem zweiten Mo-

nomer, das eine zweite DNA-Erkennungssequenz gebunden hat, Voraussetzung für die tatsächliche Aktivierung der Spaltung.

Sollten die hypothetischen *EcoRII*-Monomere jedoch an der DNA dimerisieren und dabei die DNA-bindenden Regionen I und I' sowie II und II' zwei nicht-identische DNA-Bindungstaschen bilden, ist denkbar, daß die DNA-Erkennungssequenz in einer DNA-Bindungstasche als Aktivator diene. Die DNA-Erkennungssequenz in der anderen DNA-Bindungstasche ist dann das zu spaltende Substrat. Dieser Situation entspräche, daß pro Monomer ein katalytisches Zentrum existiert, und daß die katalytischen Zentren beider Monomere gemeinsam die Spaltung der beiden Stränge einer der beiden DNA-Erkennungssequenzen katalysieren. Hierfür wären weder zwei katalytische Zentren pro Monomer noch eine umfangreiche Umordnung eines Monomers nötig.

Sollte die Dimerisierung zweier Monomere jedoch zur Bildung zweier identischer DNA-Bindungstaschen führen, zu denen die DNA-bindenden Regionen I und II' sowie I' und II beitragen, gilt das für den ersten Fall erläuterte, in dem ein Monomer alleine eine doppelsträngige DNA-Erkennungssequenz bindet. Die im folgenden zu diskutierenden Ergebnisse der Reaktionskinetiken an den Plasmid DNA-Substraten mit einem einzelnen bzw. zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* sowie die Aufklärung der Domänenorganisation von *EcoRII* ermöglichen die Beantwortung des formulierten Problems.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Spaltung einer zirkulären, superhelikalen Plasmid-DNA, die eine DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII* enthält, zeigte als Hauptprodukt der Spaltung offen zirkuläre DNA, was einer Spaltung in nur einem DNA-Strang (DNA-nicking) entspräche. Dieses Ergebnis bestätigt, daß *EcoRII* für die vollständige Spaltung des DNA-Doppelstranges essentiell die simultane Bindung von zwei DNA-Erkennungssequenzen erfordert. Darin unterscheidet sich *EcoRII* von den orthodoxen Typ II Restriktionsendonukleasen, wie z.B. der ebenfalls untersuchten Restriktionsendonuklease *PspGI*, die sehr wohl in der Lage ist, die zirkuläre, superhelikale DNA mit einer DNA-Erkennungssequenz effektiv in das lineare Produkt umzuwandeln. Im Fall von pKM1 stellt die offen zirkuläre Plasmid-DNA keine Zwischenstufe der Spaltung des DNA-Doppelstranges durch *EcoRII* dar, da der Anteil dieser Plasmid-Form im zeitlichen Verlauf der Reaktion stetig zunimmt und kein lokales Maximum durchläuft. Das zu geringem Anteil beobachtete lineare Produkt ist vermutlich auf restliche *trans*-Interaktionen zurückzuführen. Die beobachtete DNA-Nicking-Aktivität von *EcoRII* an einzelnen DNA-Erkennungssequenzen kann vielleicht in Zusammenhang mit der Entwicklung neuer Proteinfunktionen, wie z.B. dem Einzelstrangbruch im Verlauf von Rekombinationsereignissen, gesehen werden.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Spaltung einer zirkulären, superhelikalen Plasmid-DNA, die zwei DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* enthält, zeigte als Hauptprodukt lineare, einfach gespaltene Plasmid-DNA. Das entspricht einer konzertierten Spaltung der beiden Stränge einer DNA-Erkennungssequenz und bestätigt frühere Experimente mit synthetischen Oligonukleotidduplexen [47]. Würden beide Stränge beider DNA-Erkennungssequenzen in einer konzertierten Aktion gespalten, müßte als Hauptprodukt die zweifach gespaltene, lineare Plasmid-DNA entstanden sein. Das ist nicht der Fall. Die zweifach gespaltene, lineare Plasmid-DNA entsteht in geringem Anteil und ist vermutlich auf restliche *trans*-Interaktionen zwischen Spaltprodukten und Substrat zurückzuführen. Im Gegensatz dazu führt die Spaltung derselben Plasmid-DNA durch die orthodoxe Typ II Restriktionsendonuklease *PspGI* zum erwarteten Hauptprodukt, der zweifach gespaltenen linearen Plasmid-DNA. Als Reaktionszwischenstufen werden nacheinander die offen zirkuläre und die einfach gespaltene lineare Plasmid-DNA beobachtet. Für *EcoRII* wurde intermediär lediglich die offen zirkuläre Form beobachtet. Der Vergleich der Reaktionskinetiken von *EcoRII* und *PspGI* zeigt große Unterschiede in der Aktivität der beiden Enzyme. Während die Typ II Restriktionsendonuklease *PspGI* jenseits von ihren optimalen Reaktionsbedingungen vermag, die DNA vollständig zu spalten, ist die Typ IIE Restriktionsendonuklease *EcoRII* dazu selbst unter ihren optimalen Reaktionsbedingungen nicht in der Lage. Das heißt, *EcoRII* ist im Vergleich zu den orthodoxen Typ II Restriktionsendonukleasen deutlich weniger spaltaktiv. Die strukturellen Ursachen dafür konnten durch die Aufklärung der Domänenstruktur von *EcoRII* gefunden werden: Die Existenz der N-terminalen DNA-bindenden Domäne in *EcoRII* verursacht die geringere Spaltaktivität.

Hinsichtlich des Problems der Anzahl und der Anordnung der katalytischen Zentren in einem *EcoRII*-Dimer lassen sich aus den Reaktionskinetiken folgende Hypothesen ableiten. Da von *EcoRII* pro Spaltereignis, die zwei Stränge einer DNA-Erkennungssequenz gespalten werden und nicht die vier Stränge beider im aktiven Komplex gebundenen DNA-Erkennungssequenzen, ist eine konzertierte Spaltung an beiden DNA-Erkennungssequenzen wie für Typ IIF Restriktionsendonukleasen [48,49,50] auszuschließen. Darum ist es unwahrscheinlich, daß *EcoRII* zwei katalytische Zentren pro Monomer, also insgesamt vier pro Dimer, enthält. Eine Umordnung eines einzelnen katalytischen Zentrums pro Monomer, um beide Stränge einer DNA-Erkennungssequenz zu spalten, ist aus den bereits weiter oben erläuterten Gründen als eher unwahrscheinlich anzusehen. Wahrscheinlicher ist, daß ein *EcoRII*-Monomer jeweils ein katalytisches Zentrum enthält, die beide zur konzertierten Spaltung beider Stränge einer DNA-Erkennungssequenz zusammenkommen. Daher wäre zu

favorisieren, daß die DNA-bindenden Regionen I und I' der beiden Monomere eine DNA-Bindungstasche bilden und entsprechend die DNA-bindenden Regionen II und II'. Eine der beiden DNA-Bindungstaschen könnte die Bindungstasche für das aktivierende DNA-Molekül darstellen, die andere mit den katalytischen Motiven die Bindungstasche für das DNA-Substratmolekül. Diese Hypothese wird durch die Domänenstruktur von *EcoRII* und durch kürzlich veröffentlichte Homologiestudien verschiedener Restriktionsendonukleasen, die in verschiedenem Kontext CC/GG Paare innerhalb ihrer DNA-Erkennungssequenzen erkennen, bestätigt. Diese Homologiestudien sagen für *EcoRII* die Existenz eines katalytischen Zentrums pro Monomer voraus, das in der C-terminalen Hälfte von *EcoRII* liegt. Das dem mutmaßlichen katalytischen Zentrum entsprechende Sequenzmotiv wäre ²⁹⁸PDX₂₄KX₁₁E [62,63].

In der photochemischen Vernetzungsstudie suchten wir nach basenspezifischen, direkten Kontakten von *EcoRII* zu beiden Strängen der DNA-Erkennungssequenz 5'CCA/TGG, die zudem Informationen über die Symmetrie des *EcoRII*-DNA-Komplexes geben könnten. Einige der 5-Iod-2'-desoxyuridin- (X) und 5-Iod-2'-desoxycytidin-Substitutionen (Y) in der DNA-Erkennungssequenz, welche für die photochemische Vernetzung eingeführt wurden, behinderten oder verhinderten sogar die Bindung von *EcoRII* an die DNA. Das beschränkte die photochemisch vernetzbaren Substrate auf jene, die *EcoRII* binden konnte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die für andere Basensubstitutionen gefunden wurden, erkannte *EcoRII* insbesondere die Oligonukleotidsubstrate, die an der zentralen A/T-Position oder an den 5'C beider Stränge der DNA-Erkennungssequenz substituiert waren [73,78].

Die photochemische Vernetzungsstudie ergab, daß die Aminosäure Tyr⁴¹ von *EcoRII* mit dem Oligonukleotidduplex vernetzt werden konnte, das Y an der Position des 5'C im 5'CCAGG-Strang der DNA-Erkennungssequenz enthielt. Die Ausbeute der Vernetzung betrug 45 % bezogen auf die Gesamtmenge des in der Reaktion eingesetzten Proteins. Obwohl das Oligonukleotidduplex, das Y an der 5'C-Position des 5'CCTGG Stranges enthielt, von *EcoRII* gebunden werden konnte, wurde keine photochemische Vernetzung zu dieser Position gefunden. Daher ist das Muster der photochemischen Vernetzungen von *EcoRII* zur DNA-Erkennungssequenz asymmetrisch. Wie gezeigt werden konnte, ist diese Asymmetrie nicht durch die unterschiedlichen flankierenden Basenpaare der DNA-Erkennungssequenz verursacht, sondern wird durch die Asymmetrie des zentralen A/T-Basenpaares der ansonsten palindromischen DNA-Erkennungssequenz induziert. Daher entwirft die photochemische Vernetzung von *EcoRII* im Vergleich zu den Ergebnissen der DNaseI-Footprints ein differenziertes Bild. Den in beiden Strängen der DNA-

Erkennungssequenz symmetrischen DNaseI-Footprints von *EcoRII* muß nun das asymmetrische Vernetzungsmuster hinzugefügt werden, das zeigt, daß *EcoRII* zwischen dem A- und dem T-Strang der DNA-Erkennungssequenz unterscheidet.

Aufgrund der hohen Ausbeute der Vernetzung und da Y ein Nullängen-Vernetzer ist, vermuten wir, daß sich die Aminosäureseitenkette des Tyr⁴¹ im *EcoRII*-DNA-Komplex in enger Nähe zur DNA-Erkennungssequenz befindet. Aus Kokristallstrukturen von Typ II Restriktionsendonukleasen ist bekannt, daß die OH-Gruppe der Seitenkette des Tyrosins direkte Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat der DNA bilden kann (z.B. Tyr⁹⁹ und Tyr¹⁴⁴ von *BglII*), [22]. Weiterhin bildet Tyrosin über H₂O-Moleküle vermittelte Kontakte zum Phosphatrückgrat der DNA (Tyr¹⁶⁵ von *BamHI*) oder über H₂O-Moleküle vermittelte Kontakte zu den Basen der DNA-Erkennungssequenz (Tyr¹⁹⁰ von *BglII*) [18,22]. Diese Beispiele zeigen, daß und auf welche Weise Tyr⁴¹ von *EcoRII* als mit der DNA interagierend berücksichtigt werden kann. Da die Aminosäureseitenketten der konservierten katalytischen Zentren von Restriktionsendonukleasen typischerweise geladene Aminosäuren, zwei saure (Asp, Glu) und eine basische (Lys) sind, ist die Aminosäure Tyr⁴¹ von *EcoRII* vermutlich nicht Teil des aktiven Zentrums, sondern eher in die DNA-Bindung involviert. Diese Interpretation wird durch das bereits zuvor erwähnte vorhergesagte mutmaßliche katalytische Zentrum ²⁹⁸PDX₂₄KX₁₁E von *EcoRII* unterstützt, in dem Tyr⁴¹ nicht enthalten ist [62,63].

Die Eigenschaften der *EcoRII*-Mutante Y41A untermauern unsere Schlußfolgerung, daß Tyr⁴¹ eine Rolle in der spezifischen DNA-Bindung von *EcoRII* spielt. Denn der Aminosäureaustausch von Ala gegen Tyr⁴¹ hatte zur Folge, daß die DNA-Bindungsaffinität der Mutante Y41A um mehr als fünf Größenordnungen niedriger war als die des Wildtyp-*EcoRII* (bzw. sie lag unter der Nachweisgrenze unseres Gel-Shift-Versuches mit 0,1 % SDS). Jedoch hatte die Mutante Y41A eine restliche Spaltaktivität behalten. Diese geringe Spaltaktivität ist höchstwahrscheinlich durch die gestörte DNA-Bindung verursacht und kein Zeichen dafür, daß Tyr⁴¹ zum katalytischen Zentrum von *EcoRII* gehört. Aus dem Vergleich der drei Mutanten-Enzyme (H36A, H36G, Y41A), die im Ergebnis der photochemischen Vernetzungsstudie untersucht wurden, kann geschlossen werden, daß je mehr die DNA-Bindungsaffinität reduziert ist, desto mehr reduzierte sich auch die DNA-Spaltaktivität. Im Gegensatz zu den Mutanten-Enzymen H36A und H36G, ergab das Mutanten-Enzym Y41A keine Vernetzung mit dem modifizierten Oligonukleotidduplex. Das unterstützt unsere Zuordnung, daß Tyr⁴¹ die in der Vernetzung reagierende Aminosäure ist.

Die Aminosäure Tyr⁴¹ ebenso wie die Aminosäuren 25-49 des vernetzten *EcoRII*-Peptids sind nicht Teil der DNA-bindenden Regionen I und II, die mittels membran-gebundener Peptidbibliotheken gefunden wurden [51]. Da membran-gebundene Peptidbibliotheken den Beitrag elektrostatischer Wechselwirkungen im Vergleich zu anderen Wechselwirkungen hervorheben, ist es nicht möglich, mit dieser Methode individuelle Aminosäuren zu identifizieren, die spezifisch mit der *EcoRII*-DNA-Erkennungssequenz in Kontakt sind [51]. Die Identifikation des Tyr⁴¹ fügt daher ein weiteres Element, das in die DNA-Erkennung durch *EcoRII* involviert ist, zu den bekannten hinzu. Weiterhin bestätigt Tyr⁴¹, daß der N-terminale Teil von *EcoRII* substantiell zur DNA-Bindung von *EcoRII* beiträgt.

Die Untersuchungen zur Domänenstruktur von *EcoRII* durch limitierte Proteolyse mittels Trypsin und Chymotrypsin erwiesen, daß *EcoRII* mindestens aus zwei stabilen Domänen pro Monomer besteht. Die N-terminale Domäne umfaßt die Aminosäuren 4-192 und die C-terminale die Aminosäuren 173-404 der *EcoRII*-Primärsequenz. Die Aminosäuren 173-192 könnten der Region von *EcoRII* entsprechen, die beide Domänen miteinander verbindet. Die N- und die C-terminale Domäne von *EcoRII* sind voneinander trennbar und interagieren beide spezifisch mit DNA-Substraten wie wir durch die beiden gereinigten verkürzten Proteine *EcoRII*⁴⁻¹⁹² und *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ zeigen konnten. Überraschenderweise enthielt die C-terminale protease-resistente Domäne von *EcoRII*, *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴, eine aktive Typ II Restriktionsendonuklease.

Im Gegensatz zu den Typ II erfordern die Typ IIE Restriktionsendonukleasen wie *EcoRII* die simultane Bindung an zwei DNA-Erkennungsorte, um die DNA zu spalten. Sie sind nicht in der Lage, an einzelnen DNA-Erkennungsorten zu spalten. Zum Beispiel werden die beiden Genome der Bakteriophagen T3 und T7 durch *EcoRII* weder in *vivo* noch in *vitro* gespalten, da die DNA-Erkennungsorte für *EcoRII* in diesen DNA-Molekülen zu weit auseinander liegen [43]. Entfernt man jedoch die N-terminale Domäne von *EcoRII*, so bindet und spaltet *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ die DNA des Phagen T3 vollständig. Die Spalteffizienz entsprach der der Typ II Restriktionsendonuklease *BstNI*, die ein Isoschizomer von *EcoRII* ist. Die *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ Endonuklease behielt also die Sequenzspezifität von *EcoRII* bei, erforderte jedoch nicht die simultane Interaktion mit zwei DNA-Erkennungsorten, um zu spalten.

Abgesehen von der unterschiedlichen Anforderung an die Häufigkeit von DNA-Erkennungsorten von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ im Vergleich zu *EcoRII*, ist die Spaltgeschwindigkeit von *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ ungefähr 30-60 mal schneller als die von *EcoRII*. Daher reduziert die Existenz der N-terminalen Domäne in *EcoRII* die Spaltgeschwindigkeit der C-terminal kodierten

Endonuklease im kompletten *EcoRII*-Enzym und macht die simultane Bindung von zwei DNA-Erkennungsorten für die DNA-Spaltung erforderlich.

Die N-terminale Domäne trägt bedeutend zur DNA-Substratbindungskapazität von *EcoRII* bei. Die Substrataffinität von *EcoRII*⁴⁻¹⁹² ist nur eine Größenordnung kleiner als die des ganzen *EcoRII*. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der N-terminalen und der C-terminalen Domäne schlagen wir vor, daß *EcoRII* aus einer N-terminalen DNA-bindenden Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne aufgebaut ist.

Wie durch die analytische Ultrazentrifugation bestimmt wurde, liegt die N-terminale Domäne von *EcoRII* in Lösung hauptsächlich monomer vor, die C-terminale Domäne dagegen vorwiegend dimer. Das stimmt mit den Ergebnissen zur monomeren Mutante V258N überein, wonach *EcoRII* nur als intaktes Protein-Dimer spaltaktiv ist. Vorläufige Ergebnisse, die mittels membrangebundener Peptidbibliotheken Protein-Protein-Kontakte von *EcoRII* identifizierten, unterstützen die These, daß das komplette *EcoRII*-Dimer vorwiegend durch Kontakte der C-terminalen Domänen gebildet wird (C. Petter und M. Reuter, unveröffentlichte Daten). Es ist allerdings denkbar, daß die N-terminale Domäne nach der Bindung spezifischer DNA zur Dimerisierung beiträgt, da wir zwei Banden für Protein-DNA-Komplexe in unseren Gel-Shift-Versuchen sowohl für *EcoRII*⁴⁻¹⁹² als auch für die monomere Mutante V258N beobachteten.

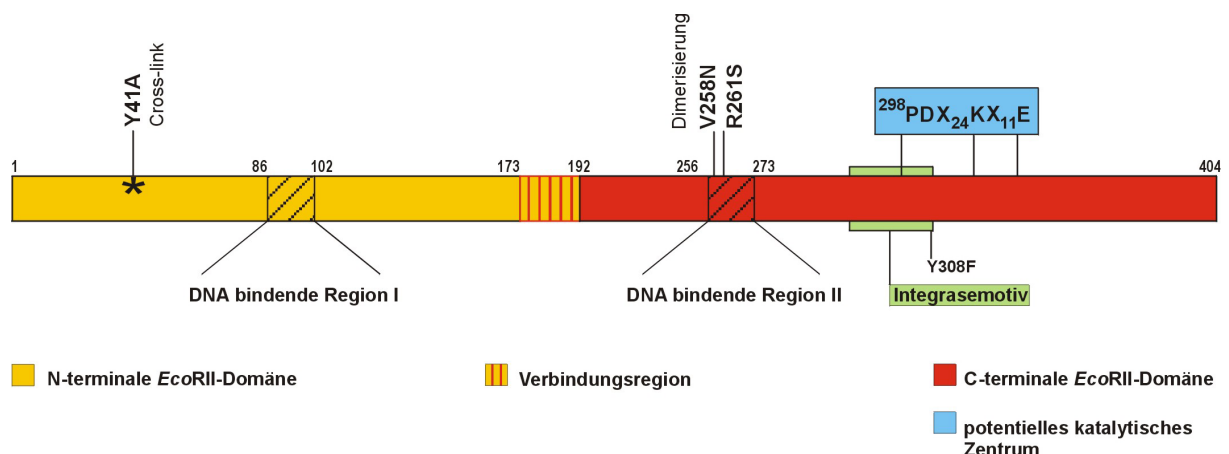


Abb. 24: Übersicht zu Domänenstruktur, DNA-bindenden Regionen, funktionellen Aminosäuren und wichtigen Aminosäuresequenzmotiven von *EcoRII* innerhalb der Primärsequenz. Der Balken entspricht den 404 Aminosäuren eines *EcoRII*-Monomers. Gelb bzw. rot, Domänen von *EcoRII*; grün, Integrasemotiv (64, 65); blau, vorhergesagtes katalytisches Zentrum [62,63]. *, photochemische Vernetzung von Tyr⁴¹ mit dem 5'C des 5'CCAGG-Stranges der *EcoRII*-Erkennungssequenz. Val²⁵⁸ und Arg²⁶¹, Aminosäuren, die zur Dimerisierung von *EcoRII* beitragen. Es wurden nicht alle bekannten, potentiell wichtigen Aminosäuren (Mutanten) aufgeführt.

Daß beide *EcoRII*-Domänen spezifisch und unabhängig mit der DNA interagieren, bestätigt die beiden früher mittels membran-gebundener Peptidbibliotheken identifizierten getrennten

DNA-bindenden Regionen I und II in der *EcoRII*-Primärsequenz [51]. Die Übersicht veranschaulicht, daß die hier beschriebene Domänenstruktur von *EcoRII* mit den bisher bekannten Resultaten bezüglich der DNA-Bindung und Katalyse konform geht (Abb. 24). In beiden *EcoRII*-Domänen befindet sich jeweils eine der DNA-bindende Regionen (Abb. 24). Die bekannten Mutationsanalysen von potentiell wichtigen Aminosäuren von *EcoRII* spiegeln ebenfalls die Funktionen der N- und der C-terminalen Domäne von *EcoRII* wider [51]. Wie bereits für die mögliche funktionelle Bedeutung der vernetzenden Aminosäure Tyr⁴¹ erörtert, beeinflusste der Austausch von Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte der *EcoRII*-Sequenz in erster Linie die DNA-Bindung und infolgedessen die Katalyse. Im Gegensatz dazu beeinflusste der Austausch von Aminosäuren in der C-terminalen Hälfte der *EcoRII*-Sequenz hauptsächlich die Katalyse, jedoch nicht detektierbar die DNA-Bindung [51]. Dieses Phänomen kann nun mit der gegenüber der C-terminalen Domäne deutlich höheren DNA-Bindungsaffinität der N-terminalen Domäne erklärt werden, die darum vermutlich für die Bindung des ersten DNA-Substratmoleküls verantwortlich ist. Wir schließen aus der hohen und der *EcoRII* vergleichbaren DNA-Bindungsaffinität der N-terminalen Domäne ($K_D = 26$ nM) außerdem, daß die N-terminale Domäne die DNA-Bindungsdissoziationskonstante des vollständigen Enzyms ($K_D = 1$ nM) determiniert. Die *EcoRII*-DNA-Interaktion stellen wir uns so vor, daß sich nach der Bindung des ersten DNA-Moleküls an die N-terminale Domäne von *EcoRII*, die Konformation von *EcoRII* ändert, was die kooperative Bindung des zweiten DNA-Substratmoleküls an die C-terminale Domäne induziert (Abb. 25). Die DNA-Substrataffinität der aus den C-terminalen Domänen geformten Bindungstasche sollte im kompletten *EcoRII* aufgrund der positiven Substratkooperativität deutlich höher sein, als für das verkürzte Protein *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴. Desweiteren vermuten wir, daß das DNA-Substratmolekül, welches an die von den C-terminalen Domänen gebildete DNA-Bindungstasche gebunden ist, gespalten wird. Das vorhergesagte aktive Zentrum von *EcoRII* ²⁹⁸PDX₂₄KX₁₁E in der C-terminalen Domäne unterstützt unsere Schlußfolgerung, daß die C-terminale Domäne die endonukleolytisch aktive ist [3,62,63]. Das aktivierend wirkende, an die N-terminalen Domänen gebundene DNA-Substratmolekül bleibt vermutlich unverändert und kann erneut in die Reaktion eintreten, sofern es dissoziiert. Über die Dissoziation der Spaltprodukte und der Aktivator-DNA ist bisher wenig bekannt. Jedoch kann *EcoRII* sogar an die eigenen Spaltprodukte binden, die dann als Aktivator-DNA wirken und somit erneut in die Reaktion eintreten können [44]. Daher ist ein vollständiger Abbau von Substrat-DNA durch *EcoRII* grundsätzlich möglich.

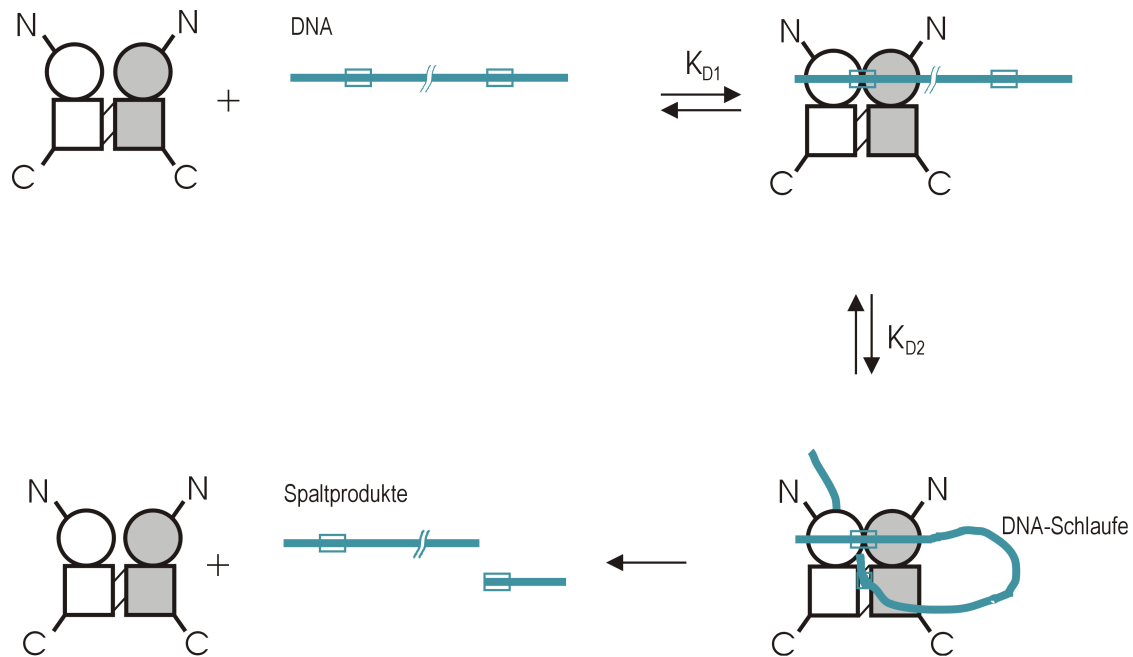


Abb. 25: Modell der *EcoRII*-DNA-Interaktion. Der Kreis symbolisiert eine N-terminale, das Quadrat eine C-terminale *EcoRII*-Domäne. Weißer Kreis und weißes Viereck bilden ein *EcoRII*-Monomer, grauer Kreis und graues Viereck das zweite Monomer eines *EcoRII*-Dimers. Die Verbindung des *EcoRII*-Dimers wird ohne spezifische DNA vermutlich vorwiegend von den C-terminalen Domänen gebildet, symbolisiert durch die dünnen Linien. Die doppelsträngige DNA ist blau, die DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII* ist durch den Kasten symbolisiert. Nach Bindung der ersten DNA-Erkennungssequenz an die von den N-terminalen Domänen gebildete DNA-Bindungstasche ändert sich vermutlich die Konformation des Proteins verbunden mit einer Erhöhung der DNA-Bindungsaffinität der von den C-terminalen Domänen gebildeten DNA-Bindungstasche (positive Substratkooperativität). Die zweite DNA-Erkennungssequenz, die dann an die von den C-terminalen Domänen gebildete DNA-Bindungstasche gebunden wird – im Fall von zwei DNA-Erkennungssequenzen in *cis* unter Schlaufenbildung, wird gespalten.

Die Domänenorganisation von *EcoRII* ähnelt der ebenfalls aus zwei Domänen bestehenden Struktur der Typ IIE Restriktionsendonuklease *NaeI* [27,38,77]. Im Fall von *NaeI* band die getrennt exprimierte und gereinigte N-terminale (Endo) Domäne, die eine für Typ II Restriktionsendonukleasen typische Faltung aufweist, weder an die DNA noch spaltete sie diese [77]. Im Gegensatz dazu band die getrennt exprimierte und gereinigte C-terminale (Topo) Domäne die DNA spezifisch und mit ähnlicher Affinität wie der *NaeI*-Wildtyp [77]. Die Domänen von *EcoRII* und *NaeI* scheinen sich weiterhin hinsichtlich der Dimerisierung zu entsprechen, denn die jeweiligen katalytischen Domänen bilden ohne spezifische DNA ein Dimer, während die jeweiligen zusätzlichen DNA-bindenden Domänen ohne spezifische DNA monomer vorliegen [27,38]. Wie auch für die N-terminale Domäne von *EcoRII* in Betracht gezogen werden kann, trägt die DNA-bindende Topo-Domäne von *NaeI* erst nach der Bindung von spezifischer DNA zur Dimerisierung bei [38]. Daher scheint die N-terminale Domäne von *EcoRII* der Topo-Domäne von *NaeI* funktionell zu entsprechen und die C-terminale Domäne von *EcoRII* der Endo-Domäne von *NaeI*.

Außer der Ähnlichkeit der Domänenorganisation von *EcoRII* zu der von *NaeI*, ähnelt die Domänenorganisation von *EcoRII* auch der der Typ IIS Restriktionsendonuklease *FokI*, die

ebenfalls aus zwei trennbaren Domänen besteht [81]. Aufgrund der erst kürzlich gefundenen Ähnlichkeit der Typ IIS (*FokI*) und Typ IIE Restriktionsendonukleasen (*EcoRII*, *NaeI*) hinsichtlich der Kristallstrukturen und der Wechselwirkung mit zwei DNA-Erkennungsorten, könnten beide Subtypen enger verwandt sein als bisher angenommen [10,75,81]. Insbesondere scheint die Gegenwart einer zweiten DNA-bindenden Domäne ein Merkmal beider Subtypen zu sein. Im Unterschied zu *NaeI* und *FokI* aber beschreibt diese Arbeit für *EcoRII*, daß die Abtrennung einer Domäne von einer Restriktionsendonuklease eine neue funktionell aktive Restriktionendonuklease hervorbringt.

Aufgrund dieser Ergebnisse spekulieren wir, daß die C-terminale Domäne von *EcoRII*, die eine aktive Restriktionsendonuklease darstellt, während der Evolution eine zusätzliche DNA-bindende Domäne akquiriert hat, um neue Proteinfunktionen zu entwickeln. Diese neu erworbene und im Vergleich zu den Typ II Restriktionsendonukleasen besondere Funktion besteht in der gleichzeitigen Interaktion mit zwei identischen DNA-Sequenzen, die an Enzyme erinnert, die zelluläre Prozesse wie die DNA-Rekombination und Transposition ausführen. Erste Daten für einen Zusammenhang zwischen *EcoRII* und Enzymen, die an solchen zellulären Prozessen beteiligt sind, findet sich in Studien zu Sequenzhomologien zwischen *EcoRII* und der Integrase-Familie der ortsspezifischen Rekombinasen. Diese Studien zeigten, daß zwischen *EcoRII* und der Integrase-Familie konservierte Aminosäurereste existieren [64,65]. Ähnlich wie der modulhafte Aufbau von *EcoRII* aus einer DNA-bindenden und einer katalytischen DNA-bindenden Domäne zeigen die Kristallstrukturen von einigen Proteinen, die in DNA-Rekombination, Reparatur oder Transposition involviert sind, Domänen oder Untereinheiten, die wie Typ II Restriktionsendonukleasen gefaltet sind. Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des Tn7 Transposaseproteins TnsA, welches die DNA-Spaltung an den 5'-Enden des Transposons katalysiert, zeigt eine den Typ II Restriktionsendonukleasen verwandte Faltung [36]. Eine den Typ II Restriktionsendonukleasen verwandte Proteinfaltung wurde ebenfalls für die λ -Exonuklease [33], die Vsr-Mismatch Reparaturenuklease [35], und das MutH Reparaturenzym gefunden [34]. Weiterhin erbrachten Sequenzvergleiche und Mutationsanalysen den Nachweis, daß die allgemeine Organisation des non-LTR Retrotransposons R2 der Arthropoden, der katalytischen Domäne der Restriktionsendonuklease *FokI* zu entsprechen scheint [82], und daß die Hjc Resolvase der *Archae*, eine Nuklease, die in den letzten Schritt der homologen Rekombination involviert ist, ein entfernt verwandtes Mitglied der Typ II Restriktionsendonuklease-Familie ist [83]. Deshalb umfaßt die Bandbreite biologischer Prozesse, an der Proteine beteiligt sind, die ähnlich einer Typ II Restriktionsendonuklease gefaltet sind, auch Proteine für die DNA-Transposition und Reparatur in Pro- und Eukaryoten. Da die Typ II Restriktionsendonuklease-ähnliche Faltung in vielen Schlüsselenzymen der DNA-Rekombination und Transposition gefunden wurde,

könnte die Entwicklung vieler DNA prozessierender Enzyme von einer sehr entfernten „Ur-Nuklease“ ausgegangen sein. Für diese Hypothese spricht ein Stammbaum der Restriktionsendonuklease-Superfamilie [84]. Auf der Grundlage dieses Stammbaums wurde vorgeschlagen, daß die unspezifisch spaltende katalytische Domäne der Restriktionsendonuklease *FokI* entwicklungsgeschichtlich älter ist als die anderen Endonukleasen ihrer Abzweigung [84], und daß die Typ IIS Restriktionsendonuklease *FokI* eine separate zusätzliche DNA-bindende Domäne erworben haben könnte. Das Erwerben einer zusätzlichen Domäne durch die Vorläuferproteine heutiger Restriktionsendonukleasen - wie vielleicht im Fall von *EcoRII* - ist daher möglicherweise der erste Schritt auf dem Weg zur Entwicklung neuer Funktionen, die über die Hydrolyse der DNA-Phosphordiesterbindung hinausgeht.

Das Auftreten der Typ II Restriktionsendonuklease-ähnlichen Faltung in Proteinen, die an der DNA-Rekombination oder Transposition beteiligt sind, verbindet diese Proteine evolutionär mit den Restriktionsendonukleasen. Eine Möglichkeit, diese Verbindung zu erklären, für die *EcoRII* vielleicht ein Zeugnis wäre, könnte in der biologischen Bedeutung der Restriktions-Modifikationsenzyme zu finden sein. Neben der allgemein bekannten biologischen Funktion der Restriktions-Modifikationsenzyme, die Wirtszelle gegen eindringende molekulare Parasiten zu schützen [2,8], diskutieren zwei weitere alternative Hypothesen die Gründe für Entwicklung und Erhalt der beeindruckend hohen Anzahl und Diversität der Gene für Restriktions-Modifikationsenzyme im Verlauf der Evolution [4,5]. Da die genetische Variation Voraussetzung für die biologische Evolution ist, wurde die Existenz von Evolutionsgenen postuliert, die die biologische Evolution begünstigen [5]. Entsprechend dieser ersten alternativen Hypothese werden Restriktions-Modifikationsenzyme zusammen mit DNA-Reparaturenzymen als Modulatoren der Häufigkeit der genetischen Variation angesehen. Denn einerseits kann angenommen werden, daß Restriktionsendonukleasen die Aufnahme fremder DNA in die Zelle auf ein geringes Niveau reduzieren, während andererseits die gespaltenen fremden DNA-Fragmente potentiell rekombinierbare DNA-Moleküle darstellen, die in das bakterielle Genom eingebaut werden könnten. Die zweite alternative Hypothese betrachtet die Gene der Restriktions-Modifikationsenzyme als egoistische, mobile genetische Elemente, wie auch Viren oder Transposons [4]. In diesem Falle wären die Restriktions-Modifikationsenzyme selbst molekulare, eventuell parasitäre Eindringlinge. Sie fördern ihre eigenen Interessen, nämlich in einer Wirtspopulation erhalten zu bleiben, unter Umständen auf Kosten des Wirts, denn sie sind tödlich für eine Wirtszelle, wenn diese das Restriktions-Modifikationssystem eliminiert. Es gibt zunehmend Beweise, insbesondere durch die Genomanalyse, die die Bedeutung der Restriktions-Modifikationssysteme in der Evolution der Bakteriengenome unterstützen [6]. Einige der vollständig sequenzierten

Bakteriengenome sind reich an Restriktions-Modifikationssystemen und zeigten, daß diese oft mit beweglichen genetischen Elementen verbunden sind, wie zum Beispiel Plasmiden, Bakteriophagen und Transposons. Weiterhin deuten die Vergleiche von Genomen an, daß sich Restriktions-Modifikationssysteme an verschiedene Positionen innerhalb eines Genoms oder ebenso zwischen verschiedenen Genomen bewegen können, und daß sie mit der Umordnung von Genomen assoziiert sind [4,5]. Der Erwerb einer neuen Proteindomäne durch entweder die Umordnung eines Genoms oder die Aufnahme eines DNA-Fragments nach der Spaltung fremder DNA könnte eine effiziente evolutionäre Strategie darstellen, die auf neue Proteinfunktionen hinausläuft. Im Fall von *EcoRII* wäre die entsprechende neue Proteinfunktion die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von *EcoRII* von der gleichzeitigen Bindung zweier DNA-Erkennungsorte. Dieses Merkmal ist eine essentielle Voraussetzung für Enzyme, die für die DNA-Transposition und DNA-Rekombination eine Rolle spielen. Es könnte das Restriktions-Modifikationssystem *EcoRII* auch befähigen, seine eigene Verbreitung in neue Lebensräume zu fördern.

4 Experimentelle Verfahren

4.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Das 1.202 bp lange DNA-Fragment mit zwei Erkennungsorten für *EcoRII* wurde durch präparative Spaltung von pUC18 DNA mit den Restriktionsenzymen *XmnI* und *AflIII* erhalten. Die beiden DNA-Erkennungsorte für *EcoRII* liegen asymmetrisch im DNA-Molekül. Um konkatamere Strukturen zu verhindern, wurden die Enden durch eine Klenow-Reaktion aufgefüllt. Danach wurde das Fragment unter Verwendung eines Gel-Extraktion Kits gereinigt (Qiagen GmbH). Die DNA-Protein Bindungsreaktion wurde in einem Volumen von 10 µl bei Raumtemperatur für 10 min durchgeführt. Die Reaktionsmischung enthielt 40 fmol der DNA und 40 fmol *EcoRII* in 25 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 mM Ca(OAc)₂; 100 mM KOAc; 2 mM DTT mit oder ohne 5 mM Mg(OAc)₂. Die Komplexe wurden durch die Zugabe von 2 % Glutardialdehyd bis zu einer Endkonzentration von 0,2 % bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Die fixierten Proben wurden mit 20 µl Verdünnungspuffer (10 mM TrisOAc, pH 7,5; 10 mM Mg(OAc)₂) verdünnt, unverzüglich an frisch geschnittenem Glimmer adsorbiert, 2 min mit 2 % Uranylacetat behandelt und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen [85]. Die Proben wurden mit Platin bei einem Druck von 10⁻⁵ beschattet und mit einer dünnen Schicht von Kohlenstoff stabilisiert. Dann wurden die Proben in destilliertem Wasser vom Glimmer abgelöst und auf Kupfergittern (600 mesh) positioniert. Die Bilder wurden mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop bei einer Spannung von 100 kV und einer primären Vergrößerung von x15.500 aufgenommen. Die Konturenängen der DNA-Moleküle wurden mit einem Digitalisieretablett (LM4, Brühl, Nürnberg) an Projektionen von Negativen der Bilder gemessen.

4.2 Ortsspezifische Mutagenese

Die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese der für *EcoRII* kodierenden DNA-Sequenz wurde entsprechend der in Referenz [51] beschriebenen Prozedur durchgeführt.

4.3 Enzymexpression und –reinigung

Das *EcoRII* Wildtyp-Enzym und sämtliche Mutanten wurden mit einem N-terminalen His₆-tag in *Escherichia coli* JM109(pDK1r⁺) Zellen exprimiert und gereinigt wie in [42] beschrieben.

4.4 DNaseI-Footprinting

Das verwendete DNA-Substrat von 282 bp Länge enthielt einen DNA-Erkennungsort für *EcoRII* und wurde durch PCR mit einem ³²P-markierten/unmarkiertem Primer-Paar in nur einem Strang markiert. Dieses DNA-Substrat (250 fmol) wurde jeweils mit steigenden Mengen der Enzyme *EcoRII*-Wildtyp und Mutante V258N in 1 x Reaktionspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 mM Ca(OAc)₂; 100 mM KOAc; 2 mM DTT; 5 mM Mg(OAc)₂; 50 µg/ml BSA) 30 min bei 0 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,025 U DNaseI wurde die DNaseI-Reaktion nach 5 min bei 0 °C mit 55 µl Stopplösung (1 % SDS; 200 mM NaCl; 20 mM EDTA) gestoppt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und in einem 8 %igen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden an dem PCR-Template mit ³²P-markierten Primern und dem Thermosequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) durchgeführt.

4.5 Gel-Shift Versuche mit *EcoRII*-Wildtyp Enzym und *EcoRII*-Mutanten zur K_D-Wert-Bestimmung

Das DNA-Substrat für die Gel-Shift Versuche mit einem Erkennungsort für *EcoRII* wurde durch Amplifikation des PCR-Templates pMM71/1 mit den Primern #1233 und #1211 (New England Biolabs) erhalten [86]. Das ³²P-radioaktiv markierte 191-bp PCR-Produkt (25 fmol) wurde mit steigenden Mengen des jeweiligen Proteins inkubiert (zum Teil abhängig von der höchst möglichen Proteinkonzentration, siehe Legenden). Die Inkubation wurde in 1 x Universalpuffer (Stratagene) und 5 % Glycerin in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 4 °C für 20 min durchgeführt. Die Proben wurden in einem 5 %igen Polyacrylamidgel mit 0,1 % SDS aufgetrennt. Das Gel lief in 1 x TBE Puffer mit 0,1 % SDS bei einer Stromstärke von 20 mA und 8 °C. Die Banden wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers (Amersham Biosciences) visualisiert und ausgewertet. Das Verhältnis von proteingebundener und gesamter Radioaktivität wurde für jede Bahn berechnet. Die scheinbare Dissoziationskonstante K_{D(app)} wurde als die Enzymkonzentration bestimmt, bei welcher 50 % der gesamten Radioaktivität proteingebunden vorlagen [51].

4.6 Test der Spaltaktivität des *EcoRII*-Wildtyp Enzyms und der unterschiedlichen *EcoRII*-Mutanten

Die Aktivitätstestung der verschiedenen Proteine wurde an pBR322 dcm⁻ DNA durchgeführt, die zuvor entweder durch die Restriktionsendonuklease *Bam*HI oder *Hind*III linearisiert worden war. Die pBR322 dcm⁻ DNA enthält sechs Erkennungsorte für *EcoRII*. Für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der DNA-Spaltung wurden 3 µg DNA und die jeweiligen Proteine im Verhältnis Protein/Erkennungsort von 1:2 eingesetzt. Die Inkubation wurde in 1 x Universalpuffer (Stratagene) bei 37 °C durchgeführt. Über einen Zeitraum von bis zu 2 h wurden Aliquots des Reaktionsansatzes entnommen und sofort mit 10 x Bromphenolblaulösung (0,042 % (m/v) Bromphenolblau, 20 mM EDTA, 1,5 % Ficoll) gestoppt. Die Spaltprodukte wurden in 0,8 %igen Agarosegelen aufgetrennt und die DNA-Banden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die Spalteffizienz wurde als Quotient aus ungespaltener DNA und Gesamt-DNA-Menge pro Bahn bestimmt.

Die Spaltaktivität des Wildtyp-Enzyms *EcoRII* und der *EcoRII*-Mutante V258N *in trans* wurde durch Inkubation von 2 pmol der jeweiligen Enzyme mit 4 pmol eines 30 bp langen, ³²P-markiertem Oligonukleotidduplexes, das einen Erkennungsort für *EcoRII* enthielt, in 1 x Universalpuffer (Stratagene) bei 37 °C für 30 min bestimmt. Das Reaktionsvolumen war 20 µl und die Spaltprodukte wurden in einem 15 %igen denaturierenden Harnstoffgel (7 M) aufgetrennt. Die Auswertung der getrockneten Gele erfolgte unter Nutzung eines PhosphorImagers.

4.7 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren des *EcoRII*-Wildtyps und der Mutante V258N wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japan) durchgeführt. Es wurden 1-ml Küvetten mit 0,2 mm Lichtweg verwendet. Die Proteinpräparation war von ≥95 % Reinheit, die Proteinkonzentration war ca. 0,29 mg/ml. Es wurden zehn Messungen bei Wellenlängen von 250-195 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 10 nm/min durchgeführt. Die Daten wurden mit der k2D-Software ausgewertet [87,88].

4.8 Zwei-dimensionale Elektrophorese

Die Methode der „Blue native Polyacrylamidgelelektrophorese“ wurde modifiziert nach [89,90] durchgeführt. Der Kathodenpuffer war zusammengesetzt aus 50 mM Tricin; 15 mM BisTris-HCl, pH 7,0 (4 °C); 0,02 % Serva blue G (Coomassie blue G-250) und der Anodenpuffer aus 50 mM BisTris-HCl, pH 7,0 (4 °C). Der 4 x Gelpuffer bestand aus 2 M Aminocapronsäure und 200 mM BisTris-HCl, pH 7,0 (4 °C). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 20 µg *EcoRII*-Wildtyp bzw. 36 µg der *EcoRII*-Mutante V258N mit 3 x Gelladepuffer (45 % Glycerin, 150 mM BisTris-HCl, pH 7,0 (4 °C) gemischt. Die Gele liefen bei 200 V, 15 mA, 4 °C über Nacht. Die Marker-Proteine waren Lactatdehydrogenase (140 kD Monomer, 280 kD Dimer), Hexokinase (99 kD), Conalbumin (78 kD), Albumin (66 kD Monomer, 132 kD Dimer) und β -Lactoglobuline (35 kD). Es wurden sieben unabhängige Experimente durchgeführt, die jeweils eine Kalibration der molekularen Massen einschloß. An die Kalibrationskurve wurde eine logarithmischen Funktion angepaßt. Die zweite Dimension bestand in einer 12 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Dazu wurde eine 1 cm breite Bahn des Gels der ersten Dimension ausgeschnitten, die die Proteinkomplexe enthielt, und kurz in einer Lösung aus 4 % SDS; 10 % Glycerin; 50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,03 % Serva Blue G; 2 % β -Mercaptoethanol gebadet. Danach wurde die Gelbahn in das 12 % SDS-Gel eingebettet. Die Elektrophorese begann mit 30 V und 9 mA bis die Farbe der Gelbahn vollständig in das Sammelgel gelaufen war und wurde bei 100 V, 40 mA und Raumtemperatur über Nacht fortgesetzt.

4.9 Analytische Ultrazentrifugation

Für die Bestimmungen der molekularen Massen wurden die Proteine in 20 mM Tris-HCl; pH 7,6; 200 mM KCl (bei *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ zusätzlich mit 2 mM EDTA) in einer analytischen Ultrazentrifuge des Typs XL-A mit UV-Scanneroptik ausgeführt. Das Sedimentationsgleichgewicht wurde unter Verwendung extern zu beladener 6-Kanal-Mittelstücke mit 12 mm Lichtweg analysiert, die gewöhnlich mit 70 µl der Proteinlösungen gefüllt waren. Drei dieser Zellen wurden gleichzeitig in einem Lauf analysiert. Im Fall des Wildtyp-Enzyms und der Mutanten-Enzyme V258N und R261S wurde das Sedimentationsgleichgewicht nach 2 h bei einer Überdrehgeschwindigkeit von 18.000 rpm, gefolgt von einer Gleichgewichtsdrehgeschwindigkeit von 14.000 rpm bei 10 °C für 24-30 h erreicht. Die radiale Absorbanz der Lösungen in jeder der sechs Zellen wurde bei den Wellenlängen 275, 280 und 285 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des *EcoRII*-Wildtyps bestimmt. Im Fall der trunkierten *EcoRII*-Derivate wurde das

Sedimentationsgleichgewicht nach 2 h Überdrehgeschwindigkeit von 24.000 rpm, gefolgt von einer Gleichgewichtsdrehgeschwindigkeit von 20.000 rpm bei 10 °C für 24-30 h erreicht. Die radialen Absorbanzen der einzelnen Zellen wurde bei 275, 280 und 285 nm oder 230, 233 und 236 nm untersucht in Abhängigkeit von Konzentration und Extinktion des jeweiligen Probe. Die durchschnittlichen molekularen Massen wurden durch gleichzeitiges Anpassen der Kurven von Sätzen von drei radialen Verteilungskurven berechnet wie früher beschrieben [91].

4.10 Kinetiken

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Spaltung wurde die Plasmid-DNA pKM1 ($C_{DNA} = C_{DNA\text{-Erkennungssequenzen}} = 3,5 \text{ nM}$) bzw. pKM2 ($C_{DNA} = 0,5 * C_{DNA\text{-Erkennungssequenzen}} = 1,75 \text{ nM}$) mit verschiedenen Mengen *EcoRII* bzw. *PspGI* inkubiert. Beide rekombinanten Plasmide wurden von G. Tamulaitis, Vilnius, Litauen erhalten. Das Plasmid pKM1 besteht aus 2.308 bp, das Plasmid pKM2 aus 2.287 bp. Die beiden DNA-Erkennungssequenzen für *EcoRII* auf pKM2 liegen in ca. 350 bp Abstand zueinander. Die Reaktionen mit *EcoRII* wurden in 1 * Yellowpuffer (MBI Fermentas) ohne $Mg(OAc)_2$, die Reaktionen mit *PspGI* in 1 * Greenbuffer (MBI Fermentas) ohne $MgCl_2$ inkubiert. Nach 5 min Vorinkubation bei 37 °C für *EcoRII* bzw. 25 °C für *PspGI* wurde die Reaktion mit 1/10 Reaktionsvolumen der entsprechenden 100 mM- Mg^{2+} Lösungen gestartet. Das Reaktionsvolumen war 300 µl. Pro Zeitpunkt wurden 35 µl entnommen und mit 10 µl Stopplösung (75 mM EDTA, 50 % Glycerin, 0,3 % SDS, pH 7,8 bei 25 °C) beendet. Die Proben wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert. Für die Stimulierung der Spaltung der Plasmid-DNA pKM1 wurde zusätzlich ein spezifischer bzw. unspezifischer 33 bp langer Oligonukleotidduplex zum Reaktionsansatz zugegeben. Der spezifische Oligonukleotidduplex enthielt eine DNA-Erkennungssequenz für *EcoRII*.

4.11 Gel-Shift-Versuche und Spaltung der für die photochemische Vernetzung modifizierten Oligonukleotidduplexe

Die Oligonukleotidduplexe für die photochemische Vernetzung mit *EcoRII* wurden bei der Firma Interactiva Biotechnologie GmbH synthetisiert. Die Sequenz des unmodifizierten Oligonukleotids war 5'GTTAGAGCAGGTTGGCGAC (DNA-Erkennungssequenz von *EcoRII*, unterstrichen). Die Modifikationen der DNA-Erkennungssequenz bestanden entweder in der Substitution des C durch 5-Iod-2'-desoxycytidin oder der Basen A, G oder T durch 5-Iod-2'-desoxyuridin. Wenn angegeben, wurden die Oligonukleotidduplexe radioaktiv

mit Hilfe von T4 Polynukleotidkinase (New England Biolabs) und γ -³²P-ATP (Hartmann Analytic) markiert. Um den Einfluß der die Erkennungssequenz flankierenden Basenpaare auf die DNA-Erkennung und auf das photochemische Vernetzungsmuster zu untersuchen (fett), verwendeten wir das folgende unmodifizierte Oligonukleotid 5'-GTT **AGA GCC AGG CTC** GCA GC-3'. In diesem Oligonukleotidduplex ersetzten wir entweder das 5'C des A- oder T-Stranges der DNA-Erkennungssequenz (unterstrichen) durch 5-Iod-2'-desoxycytidin (Y). Zusätzlich führten wir in dem durch Y ersetzten 5'C im A-Strang des modifizierten Oligonukleotidduplexes anstelle des zentralen A/T-Paares eine T/T-Fehlpaarung ein, um nach den Ursachen des asymmetrischen Vernetzungsmusters zu suchen. Um den Einfluß des zentralen A/T-Paares auf die Asymmetrie des photochemischen Vernetzungsmusters zu analysieren, führten wir weitere Vernetzungsreaktionen mit einem selbstkomplementären Oligonukleotid 5'-**CTCCCA/TGGGAG** durch, das 5-Iod-2'-desoxyuridin (X) anstelle von T oder X anstelle von beiden Basen, A und T, an der zentralen Basenpaarposition enthielt.

Für die Gel-Shift Versuche wurden 0,2 µM der ³²P-markierten Oligonukleotidduplexe mit 0,4 µM *EcoRII*-Wildtyp Enzym in 1 x Universalpuffer (Stratagene) und 5 % Glycerin in einem Volumen von 20 µl bei 0 °C für 15 min inkubiert. Die Reaktionsmischungen wurden in einem 5 % nativen Polyacrylamidgel bei 15 mA und 8 °C aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und mit Hilfe eines PhosphorImagers ausgewertet.

Für die Spaltung wurden 0,25 µM der modifizierten Oligonukleotidduplexe mit 0,5 µM *EcoRII*-Wildtyp Enzym in 1 x Universalpuffer (Stratagene) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Spaltprodukte wurden in einem 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und die radioaktiven Banden wurden mittels PhosphorImager analysiert.

4.12 Photochemische Vernetzungsreaktion mit *EcoRII*

Um zu testen, welche der modifizierten Basen eine photochemische Vernetzung mit *EcoRII* ermöglichen würde, wurden 3,75 µM *EcoRII* und 7,5 µM eines der mono-substituierten, radioaktiv markierten Oligonukleotidduplexe in 1 x Universalpuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammengegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann mit einem 40 mW He/Cd-Laser mit einer Wellenlänge von 325 nm (Laser 2000) bei 0 °C für 45 min bestrahlt. Für die kinetischen Untersuchungen wurde für 0-120 min bestrahlt. Proben von 2 µl wurden in einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung nachgewiesen, radioaktive Banden wurden zusätzlich durch den PhosphorImager detektiert.

4.13 Identifikation des photochemisch vernetzten *EcoRII*-Peptids

Gelbanden von freiem und vernetzten *EcoRII*, die ungefähr 15 pmol Protein entsprachen, wurden aus einem 12 % igen SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Die Gelscheiben wurden zu Würfeln von ca. 1 mm³ zerkleinert und danach dreimal mit einem dem Volumen der Gelwürfel entsprechenden Volumen von 50/50 (v/v) 0,5 M Tris-HCl, pH 8,5/Acetonitril bei 30 °C für 20 min gewaschen. Die Gelwürfel wurden getrocknet und danach in 0,1 M (NH₄)₂CO₃, 10 mM DTT, 1 mM EDTA bei 60 °C für 45 min rehydriert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteine wurden im Gel mit 100 mM Iodacetamid in 0,1 M (NH₄)₂CO₃ bei Raumtemperatur für 30 min alkyliert. Danach wurden die Gelwürfel wie zuvor gewaschen. Für den Verdau von *EcoRII* durch Trypsin wurden die Gelwürfel in 0,05 M Tris-HCl, pH 8,5, 10 % Acetonitril, 1 mM CaCl₂ rehydriert und mit Trypsin in einem Massenverhältnis von $m_{\text{Trypsin}}/m_{\text{EcoRII}}$ von 1:1 bis 1:10 bei 37 °C über 16 h inkubiert. Um die Peptide aus dem Gel zu extrahieren, wurden die Gelwürfel in zwei Volumina 2 % TFA bei 60 °C für 30 min inkubiert. Die im Überstand erhaltene Peptidmischung wurde durch Reversed Phase HPLC unter Verwendung einer μ RPC C2/C18 SC2.1/10 Säule und des SMART-Systems (Amersham Biosciences) aufgetrennt. Die Peptide eluierten in einem Gradienten von 0,5 %/min B (0,1 % TFA in Acetonitril) in A (0,1 % TFA in Wasser) bei einer Flußrate von 100 μ l/min. Das Peptid, in denen sich die Chromatogramme basierend auf dem freien *EcoRII* und dem vernetzten *EcoRII* unterschieden, wurde an einem TMProcise Protein Sequenzierautomaten (Applied Biosystems Inc.) sequenziert.

4.14 Limitierte Proteolyse von *EcoRII* in Gegenwart und Abwesenheit von DNA

Der proteolytische Abbau von 30 μ g *EcoRII* (325 pmol) durch Trypsin wurde bei einem Massenverhältnis $m_{\text{EcoRII}}/m_{\text{Trypsin}}$ von 100/1 mit oder ohne 1,3 nmol eines spezifischen 20 bp Oligonukleotidduplexes (5'-GCTGCCAACCTGGCTCTAAC) bei 37 °C durchgeführt. Der Abbau von 48,3 μ g *EcoRII* (260 pmol) durch Chymotrypsin wurde bei einem Massenverhältnis $m_{\text{EcoRII}}/m_{\text{Chymotrypsin}}$ von 80/1 mit oder ohne 1,05 nmol des spezifischen 20 bp Oligonukleotidduplexes bei 25 °C durchgeführt. Alle Abbaureaktionen verliefen in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 in einem Reaktionsvolumen von 200 μ l. Über einen Zeitraum von 0-16 h wurden Proben von 18 μ l entnommen. Die Proteolysereaktion wurde mit 3 x SDS-Gelladepuffer [187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 6 % (m/v) SDS; 30 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau, 120 mM DTT] gestoppt und unverzüglich bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die proteolytischen Fragmente wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

4.15 Edman-Sequenzierung

Die proteolytischen Fragmente wurden auf ProBlott™ Membranen (Applied Biosystems Inc.) geblottet. Folgende Puffer wurden verwendet: Anodenpuffer 1 (0,3 M Trishydroxyaminomethan; 15 % CH₃OH), Anodenpuffer 2 (25 mM Trishydroxyaminomethan; 15 % CH₃OH) und Kathodenpuffer (25 mM Trishydroxyaminomethan; 40 mM ε-Aminocaprinsäure; 15 % CH₃OH). Nach dem Blotten wurden die Banden durch Färbung mit 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250, 1 % CH₃COOH, 40 % CH₃OH in Wasser sichtbar gemacht, aus der Membran geschnitten und mittels einem Sequenzierautomaten (Perkin Elmer/Applied Biosystems Inc., Modell 420) sequenziert.

4.16 Klonierung und Expression der protease-resistenten Domänen von *EcoRII*

Die für die protease-resistenten Domänen von *EcoRII* kodierende DNA wurde durch PCR hergestellt. Das PCR-Template war das vom pQE-30 Expressionsvektor (Qiagen) abstammende Plasmid pQE-RII [42]. Für das C-terminal verkürzte Protein *EcoRII*⁴⁻¹⁹² wurden die PCR-Primer 5'AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC und 5'GCGCAGGTGC CAGTCTTCAG GTAGAATATA verwendet. Der pQE-30 Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SmaI* geöffnet und mit alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert. Das 633 bp lange PCR-Produkt wurde ebenfalls mit *EcoRI* gespalten, mittels T4 Polynukleotidkinase und ATP phosphoryliert (New England Biolabs) und mit Hilfe des Ready-To-Go-Ligase Kits (Amersham Biosciences) in den pQE-30 Vektor ligiert. Für das N-terminal verkürzte Protein *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ wurde wiederum das Plasmid pQE-RII als Template und die PCR-Primer 5'CGCGGATCCT CTCTACAGCA AGCGCCAGTA AATCATAAA und 5'GTACCTATGG AATATCTGCG TAAAGCCCTG T verwendet. Der pQE-30 Vektor wurde hier nacheinander mit den Restriktionsendonuklease *SmaI* und *BamHI* gespalten und mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das 703 bp lange PCR-Produkt wurde ebenfalls mit *BamHI* gespalten, mit T4 Polynukleotidkinase und ATP phosphoryliert und mit Hilfe von T4 DNA Ligase (New England Biolabs) in den Vektor pQE-30 ligiert. Die erhaltenen rekombinanten Plasmide wurden durch Sequenzierung mit dem Thermosequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) überprüft. Alle Aminosäurepositionen beziehen sich auf die *EcoRII*-Sequenz AJ224995, die mit Met³ von *EcoRII* beginnt. Der Vektor pQE30 kodiert auch für den N-terminalen His₆-Schwanz beider Mutanten (Aminosäuresequenz: MRGSHHHHHHGS).

4.17 Western Blots

Die Spezifität der trunkierten *EcoRII*-Derivate und des *EcoRII*-Wildtyp Enzym wurden in Western-Blot-Experimenten getestet. Die Proteine wurden in 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und danach innerhalb einer Stunde mittels einer Semidry-Blotapparatur (Hoefer, Semiphor) bei 1 mA/cm² auf eine PVDF-Membran überführt. Die Membran wurde dann mit 1 x PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,3) gewaschen. Das Blockieren der Membran erfolgte mit 10 % neonatalem Kälberserum; 0,04 % Natriumazid und 0,2 % Tween in 1 x PBS für 1 h. Danach wurde der Blot für 1 h oder über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper (polyklonales Kaninchen *EcoRII*-Antiserum, 1:2000 in Blockierungslösung oder Maus anti His, Nr. 34610 von QIAGEN, 1:1000 in Blockierungslösung) inkubiert. Die Membranen wurden dreimal mit 1 x PBS und 0,2 % Tween gewaschen und nachfolgend mit dem jeweiligen sekundären Antikörpern (donkey-anti-rabbit Peroxidase-konjugiert, 1:2500 bzw. goat-anti-mouse Peroxidase-konjugiert, 1:10.000, beide Pierce) verdünnt in 1 x PBS; 0,2 % Tween; 10 % neonatalem Kälberserum für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Blots in 1 x PBS mit 0,2 % Tween für je 10 min wurden die spezifischen Banden durch eine Chemilumineszenzreaktion mit Super Signal Dura West Substrat (Pierce) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Blots nach dem letzten Waschen getrocknet und für 1 min in einer Lösung aus Luminol:Peroxide:Wasser = 1:1:8 inkubiert. Die Aufnahme der Signale erfolgt mit einer CCD-Kamera (Alpha Innotech Corporation) bei 482 nm.

4.18 Spaltung von DNA des Phagen T3 mit Wildtyp-*EcoRII* und *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴

Für die Spaltung von T3-Phagen-DNA (35,1 fmol Erkennungsorte) wurden die Enzyme *EcoRII*-Wildtyp und das trunkierte *EcoRII*-Derivat *EcoRII*¹⁷³⁻⁴⁰⁴ in den Enzym/Erkennungsort-Verhältnissen 0,5 und 500 in 1 x Universalpuffer (Stratagene) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Das Reaktionsvolumen war 20 µl. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,6 % Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

5 Referenzen

- [1] Wilson, G. G. und Murray, N. E. (1991): Restriction and modification systems, *Annu.Rev.Genet.* **25**, Seite 585-627. URL: PM:1812816
- [2] Redashi, N. und Bickle T.A. (1996): DNA restriction and modification systems., Neidhardt, F. C., *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. 1, 2nd. Auflage, Seite 773-781, ASM Press, Washington, D.C., ISBN: 1-55581-084-5W.
- [3] Pingoud, A. und Jeltsch, A. (2001): Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucleic Acids Res.* **29** [18], Seite 3705-3727. URL: PM:11557805
- [4] Kobayashi, I. (2001): Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution, *Nucleic Acids Res.* **29** [18], Seite 3742-3756. URL: PM:11557807
- [5] Arber, W. (2000): Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution, *FEMS Microbiol.Rev.* **24** [1], Seite 1-7. URL: PM:10640595
- [6] Rocha, E. P.; Danchin, A. und Viari, A. (2001): Evolutionary role of restriction/modification systems as revealed by comparative genome analysis, *Genome Res.* **11** [6], Seite 946-958. URL: PM:11381024
- [7] Roberts, R. J. und Macelis, D. (2001): REBASE--restriction enzymes and methylases, *Nucleic Acids Res.* **29** [1], Seite 268-269. URL: PM:11125108
- [8] Bickle, T. A. und Kruger, D. H. (1993): Biology of DNA restriction, *Microbiol.Rev.* **57** [2], Seite 434-450. URL: PM:8336674
- [9] Szybalski, W.; Kim, S. C.; Hasan, N. und Podhajska, A. J. (1991): Class-IIS restriction enzymes--a review, *Gene* **100**, Seite 13-26. URL: PM:2055464
- [10] Bitinaite, J.; Wah, D. A.; Aggarwal, A. K. und Schildkraut, I. (1998): FokI dimerization is required for DNA cleavage, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** [18], Seite 10570-10575. URL: PM:9724744
- [11] Vanamee, E. S.; Santagata, S. und Aggarwal, A. K. (2001): FokI requires two specific DNA sites for cleavage, *J.Mol.Biol.* **309** [1], Seite 69-78. URL: PM:11491302
- [12] Kruger, D. H.; Kupper, D.; Meisel, A.; Reuter, M. und Schroeder, C. (1995): The significance of distance and orientation of restriction endonuclease recognition sites in viral DNA genomes, *FEMS Microbiol.Rev.* **17** [1-2], Seite 177-184. URL: PM:7669344
- [13] Yang, C. C. und Topal, M. D. (1992): Nonidentical DNA-binding sites of endonuclease NaeI recognize different families of sequences flanking the recognition site, *Biochemistry* **31** [40], Seite 9657-9664. URL: PM:1390742
- [14] Boyer, H. W.; Chow, L. T.; Dugaiczyk, A.; Hedgpeth, J. und Goodman, H. M. (1973): DNA substrate site for the *EcoRII* restriction endonuclease and modification methylase, *Nat.New Biol.* **244** [132], Seite 40-43. URL: PM:4124385
- [15] Gabbara, S. und Bhagwat, A. S. (1992): Interaction of *EcoRII* endonuclease with DNA substrates containing single recognition sites, *J.Biol.Chem.* **267** [26], Seite 18623-18630. URL: PM:1526995
- [16] Halford, S. E.; Bilcock, D. T.; Stanford, N. P.; Williams, S. A.; Milsom, S. E.; Gormley, N. A.; Watson, M. A.; Bath, A. J.; Embleton, M. L.; Gowers, D. M.; Daniels, L. E.; Parry,

- S. H. und Szczelkun, M. D. (1999): Restriction endonuclease reactions requiring two recognition sites, *Biochem.Soc.Trans.* **27** [4], Seite 696-699. URL: PM:10917669
- [17] Kim, Y. C.; Grable, J. C.; Love, R.; Greene, P. J. und Rosenberg, J. M. (1990): Refinement of Eco RI endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing, *Science* **249** [4974], Seite 1307-1309. URL: PM:2399465
- [18] Newman, M.; Strzelecka, T.; Dorner, L. F.; Schildkraut, I. und Aggarwal, A. K. (1994): Structure of restriction endonuclease BamHI and its relationship to EcoRI, *Nature* **368** [6472], Seite 660-664. URL: PM:8145855
- [19] Athanasiadis, A.; Vlassi, M.; Kotsifaki, D.; Tucker, P. A.; Wilson, K. S. und Kokkinidis, M. (1994): Crystal structure of PvuII endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV, *Nat.Struct.Biol.* **1** [7], Seite 469-475. URL: PM:7664066
- [20] Winkler, F. K.; Banner, D. W.; Oefner, C.; Tsernoglou, D.; Brown, R. S.; Heathman, S. P.; Bryan, R. K.; Martin, P. D.; Petratos, K. und Wilson, K. S. (1993): The crystal structure of EcoRV endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments, *EMBO J.* **12** [5], Seite 1781-1795. URL: PM:8491171
- [21] Newman, M.; Lunnen, K.; Wilson, G.; Greci, J.; Schildkraut, I. und Phillips, S. E. (1998): Crystal structure of restriction endonuclease BglII bound to its interrupted DNA recognition sequence, *EMBO J.* **17** [18], Seite 5466-5476. URL: PM:9736624
- [22] Lukacs, C. M.; Kucera, R.; Schildkraut, I. und Aggarwal, A. K. (2000): Understanding the immutability of restriction enzymes: crystal structure of BglII and its DNA substrate at 1.5 Å resolution, *Nat.Struct.Biol.* **7** [2], Seite 134-140. URL: PM:10655616
- [23] van der Woerd, M. J.; Pelletier, J. J.; Xu, S. und Friedman, A. M. (2001): Restriction enzyme BsoBI-DNA complex: a tunnel for recognition of degenerate DNA sequences and potential histidine catalysis, *Structure.(Camb.)* **9** [2], Seite 133-144. URL: PM:11250198
- [24] Deibert, M.; Grazulis, S.; Janulaitis, A.; Siksnys, V. und Huber, R. (1999): Crystal structure of MunI restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.7 Å resolution, *EMBO J.* **18** [21], Seite 5805-5816. URL: PM:10545092
- [25] Horton, N. C.; Dorner, L. F. und Perona, J. J. (2002): Sequence selectivity and degeneracy of a restriction endonuclease mediated by DNA intercalation, *Nat.Struct.Biol.* **9** [1], Seite 42-47. URL: PM:11742344
- [26] Wah, D. A.; Hirsch, J. A.; Dorner, L. F.; Schildkraut, I. und Aggarwal, A. K. (1997): Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA, *Nature* **388** [6637], Seite 97-100. URL: PM:9214510
- [27] Huai, Q.; Colandene, J. D.; Chen, Y.; Luo, F.; Zhao, Y.; Topal, M. D. und Ke, H. (2000): Crystal structure of NaeI-an evolutionary bridge between DNA endonuclease and topoisomerase, *EMBO J.* **19** [12], Seite 3110-3118. URL: PM:10856254
- [28] Bozic, D.; Grazulis, S.; Siksnys, V. und Huber, R. (1996): Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease Cfr10I at 2.15 Å resolution, *J.Mol.Biol.* **255** [1], Seite 176-186. URL: PM:8568865
- [29] Deibert, M.; Grazulis, S.; Sasnauskas, G.; Siksnys, V. und Huber, R. (2000): Structure of the tetrameric restriction endonuclease NgoMIV in complex with cleaved DNA, *Nat.Struct.Biol.* **7** [9], Seite 792-799. URL: PM:10966652
- [30] Grazulis, S.; Deibert, M.; Rimseliene, R.; Skirgaila, R.; Sasnauskas, G.; Lagunavicius, A.; Repin, V.; Urbanke, C.; Huber, R. und Siksnys, V. (2002): Crystal structure of the Bse634I restriction endonuclease: comparison of two enzymes recognizing the same DNA sequence, *Nucleic Acids Res.* **30** [4], Seite 876-885. URL: PM:11842098

- [31] Kovall, R. A. und Matthews, B. W. (1999): Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships, *Curr.Opin.Chem.Biol.* **3** [5], Seite 578-583. URL: PM:10508668
- [32] Venclovas, C. und Siksnys, V. (1995): Different enzymes with similar structures involved in Mg(2+)-mediated polynucleotidyl transfer, *Nat.Struct.Biol.* **2** [10], Seite 838-841. URL: PM:7552704
- [33] Kovall, R. A. und Matthews, B. W. (1998): Structural, functional, and evolutionary relationships between lambda-exonuclease and the type II restriction endonucleases, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** [14], Seite 7893-7897. URL: PM:9653111
- [34] Ban, C. und Yang, W. (1998): Structural basis for MthH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MthH to restriction endonucleases, *EMBO J.* **17** [5], Seite 1526-1534. URL: PM:9482749
- [35] Tsutakawa, S. E. und Morikawa, K. (2001): The structural basis of damaged DNA recognition and endonucleolytic cleavage for very short patch repair endonuclease, *Nucleic Acids Res.* **29** [18], Seite 3775-3783. URL: PM:11557809
- [36] Hickman, A. B.; Li, Y.; Mathew, S. V.; May, E. W.; Craig, N. L. und Dyda, F. (2000): Unexpected structural diversity in DNA recombination: the restriction endonuclease connection, *Mol.Cell* **5** [6], Seite 1025-1034. URL: PM:10911996
- [37] Anderson, J. E. (1993): Restriction endonucleases and modification methylases., *Curr.Opin.Struct.Biol.* **3**, Seite 24-30.
- [38] Huai, Q.; Colandene, J. D.; Topal, M. D. und Ke, H. (2001): Structure of NaeI-DNA complex reveals dual-mode DNA recognition and complete dimer rearrangement, *Nat.Struct.Biol.* **8** [8], Seite 665-669. URL: PM:11473254
- [39] Viadiu, H. und Aggarwal, A. K. (2000): Structure of BamHI bound to nonspecific DNA: a model for DNA sliding, *Mol.Cell* **5** [5], Seite 889-895. URL: PM:10882125
- [40] von Hippel, P. H. und Berg, O. G. (1989): Facilitated target location in biological systems, *J.Biol.Chem.* **264** [2], Seite 675-678. URL: PM:2642903
- [41] Sidorova, N. Y. und Rau, D. C. (1996): Differences in water release for the binding of EcoRI to specific and nonspecific DNA sequences, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** [22], Seite 12272-12277. URL: PM:8901570
- [42] Reuter, M.; Kupper, D.; Meisel, A.; Schroeder, C. und Kruger, D. H. (1998): Cooperative binding properties of restriction endonuclease *EcoRII* with DNA recognition sites, *J.Biol.Chem.* **273** [14], Seite 8294-8300. URL: PM:9525936
- [43] Kruger, D. H.; Barcak, G. J.; Reuter, M. und Smith, H. O. (1988): *EcoRII* can be activated to cleave refractory DNA recognition sites, *Nucleic Acids Res.* **16** [9], Seite 3997-4008. URL: PM:2836807
- [44] Pein, C. D.; Reuter, M.; Cech, D. und Kruger, D. H. (1989): Oligonucleotide duplexes containing CC(A/T)GG stimulate cleavage of refractory DNA by restriction endonuclease *EcoRII*, *FEBS Lett.* **245** [1-2], Seite 141-144. URL: PM:2784394
- [45] Kupper, D.; Reuter, M.; Mackeldanz, P.; Meisel, A.; Alves, J.; Schroeder, C. und Kruger, D. H. (1995): Hyperexpressed *EcoRII* renatured from inclusion bodies and native enzyme both exhibit essential cooperativity with two DNA sites, *Protein Expr.Purif.* **6** [1], Seite 1-9. URL: PM:7756833
- [46] Petrauskene, O. V.; Karpova, E. A.; Gromova, E. S. und Guschlbauer, W. (1994): Two subunits of *EcoRII* restriction endonuclease interact with two DNA recognition sites, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **198** [3], Seite 885-890. URL: PM:8117292
- [47] Petrauskene, O. V.; Babkina, O. V.; Tashlitsky, V. N.; Kazankov, G. M. und Gromova, E. S. (1998): *EcoRII* endonuclease has two identical DNA-binding sites and cleaves

- one of two co-ordinated recognition sites in one catalytic event, *FEBS Lett.* **425** [1], Seite 29-34. URL: PM:9541001
- [48] Wentzell, L. M.; Nobbs, T. J. und Halford, S. E. (1995): The *SfiI* restriction endonuclease makes a four-strand DNA break at two copies of its recognition sequence, *J.Mol.Biol.* **248** [3], Seite 581-595. URL: PM:7752226
- [49] Siksnys, V.; Skirgaila, R.; Sasnauskas, G.; Urbanke, C.; Cherny, D.; Grazulis, S. und Huber, R. (1999): The *Cfr10I* restriction enzyme is functional as a tetramer, *J.Mol.Biol.* **291** [5], Seite 1105-1118. URL: PM:10518946
- [50] Embleton, M. L.; Siksnys, V. und Halford, S. E. (2001): DNA cleavage reactions by type II restriction enzymes that require two copies of their recognition sites, *J.Mol.Biol.* **311** [3], Seite 503-514. URL: PM:11493004
- [51] Reuter, M.; Schneider-Mergener, J.; Kupper, D.; Meisel, A.; Mackeldanz, P.; Kruger, D. H. und Schroeder, C. (1999): Regions of endonuclease *EcoRII* involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires, *J.Biol.Chem.* **274** [8], Seite 5213-5221. URL: PM:9988771
- [52] Blatter, E. E.; Ebright, Y. W. und Ebright, R. H. (1992): Identification of an amino acid-base contact in the GCN4-DNA complex by bromouracil-mediated photocrosslinking, *Nature* **359** [6396], Seite 650-652. URL: PM:1406998
- [53] Meisenheimer, K. M.; Meisenheimer, P. L.; Willis, M. C. und Koch, T. H. (1996): High yield photocrosslinking of a 5-iodocytidine (IC) substituted RNA to its associated protein, *Nucleic Acids Res.* **24** [5], Seite 981-982. URL: PM:8600470
- [54] Wang, Y. und Adzuma, K. (1996): Differential proximity probing of two DNA binding sites in the *Escherichia coli* *recA* protein using photo-cross-linking methods, *Biochemistry* **35** [11], Seite 3563-3571. URL: PM:8639507
- [55] Malkov, V. A.; Biswas, I.; Camerini-Otero, R. D. und Hsieh, P. (1997): Photocross-linking of the NH2-terminal region of *Taq* MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA, *J.Biol.Chem.* **272** [38], Seite 23811-23817. URL: PM:9295328
- [56] Jenkins, T. M.; Esposito, D.; Engelman, A. und Craigie, R. (1997): Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photo-crosslinking, *EMBO J.* **16** [22], Seite 6849-6859. URL: PM:9362498
- [57] Pingoud, V.; Thole, H.; Christ, F.; Grindl, W.; Wende, W. und Pingoud, A. (1999): Photocross-linking of the homing endonuclease *PI-SceI* to its recognition sequence, *J.Biol.Chem.* **274** [15], Seite 10235-10243. URL: PM:10187809
- [58] Holz, B.; Dank, N.; Eickhoff, J. E.; Lipps, G.; Krauss, G. und Weinhold, E. (1999): Identification of the binding site for the extrahelical target base in N6-adenine DNA methyltransferases by photo-cross-linking with duplex oligodeoxyribonucleotides containing 5-iodouracil at the target position, *J.Biol.Chem.* **274** [21], Seite 15066-15072. URL: PM:10329711
- [59] Kubareva, E. A.; Thole, H.; Karyagina, A. S.; Oretskaya, T. S.; Pingoud, A. und Pingoud, V. (2000): Identification of a base-specific contact between the restriction endonuclease *SsoII* and its recognition sequence by photocross-linking, *Nucleic Acids Res.* **28** [5], Seite 1085-1091. URL: PM:10666447
- [60] Wong, D. L. und Reich, N. O. (2000): Identification of tyrosine 204 as the photo-cross-linking site in the DNA-*EcoRI* DNA methyltransferase complex by electrospray ionization mass spectrometry, *Biochemistry* **39** [50], Seite 15410-15417. URL: PM:11112526
- [61] Morgan, R.; Xiao, J. und Xu, S. (1998): Characterization of an extremely thermostable restriction enzyme, *PspGI*, from a *Pyrococcus* strain and cloning of the *PspGI*

- restriction-modification system in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **64** [10], Seite 3669-3673. URL: PM:9758783
- [62] Tamulaitis, G.; Solonin, A. S. und Siksnys, V. (2002): Alternative arrangements of catalytic residues at the active sites of restriction enzymes, *FEBS Lett.* **518** [1-3], Seite 17-22. URL: PM:11997010
- [63] Pingoud, V.; Kubareva, E.; Stengel, G.; Friedhoff, P.; Bujnicki, J. M.; Urbanke, C.; Sudina, A. und Pingoud, A. (2002): Evolutionary Relationship between Different Subgroups of Restriction Endonucleases, *J. Biol. Chem.* **277** [16], Seite 14306-14314. URL: PM:11827971
- [64] Nunes-Duby, S. E.; Kwon, H. J.; Tirumalai, R. S.; Ellenberger, T. und Landy, A. (1998): Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases, *Nucleic Acids Res.* **26** [2], Seite 391-406. URL: PM:9421491
- [65] Topal, M. D. und Conrad, M. (1993): Changing endonuclease *EcoRII* Tyr308 to Phe abolishes cleavage but not recognition: possible homology with the Int-family of recombinases, *Nucleic Acids Res.* **21** [11], Seite 2599-2603. URL: PM:8392701
- [66] Jo, K. und Topal, M. D. (1995): DNA topoisomerase and recombinase activities in *Nae I* restriction endonuclease, *Science* **267** [5205], Seite 1817-1820. URL: PM:7892605
- [67] Willis, M. C.; Hicke, B. J.; Uhlenbeck, O. C.; Cech, T. R. und Koch, T. H. (1993): Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins, *Science* **262** [5137], Seite 1255-1257. URL: PM:7694369
- [68] Wong, D. L.; Pavlovich, J. G. und Reich, N. O. (1998): Electrospray ionization mass spectrometric characterization of photocrosslinked DNA-*EcoRI* DNA methyltransferase complexes, *Nucleic Acids Res.* **26** [2], Seite 645-649. URL: PM:9421528
- [69] Topal, M. D.; Thresher, R. J.; Conrad, M. und Griffith, J. (1991): *NaeI* endonuclease binding to pBR322 DNA induces looping, *Biochemistry* **30** [7], Seite 2006-2010. URL: PM:1847081
- [70] Friedhoff, P.; Lurz, R.; Luder, G. und Pingoud, A. (2001): *Sau3AI*, a monomeric type II restriction endonuclease that dimerizes on the DNA and thereby induces DNA loops, *J. Biol. Chem.* **276** [26], Seite 23581-23588. URL: PM:11316811
- [71] Wentzell, L. M. und Halford, S. E. (1998): DNA looping by the *Sfi I* restriction endonuclease, *J. Mol. Biol.* **281** [3], Seite 433-444. URL: PM:9698559
- [72] Nobbs, T. J.; Szczelkun, M. D.; Wentzell, L. M. und Halford, S. E. (1998): DNA excision by the *Sfi I* restriction endonuclease, *J. Mol. Biol.* **281** [3], Seite 419-432. URL: PM:9698558
- [73] Yolov, A. A.; Gromova, E. S.; Romanova, E. A.; Oretskaya, T. S.; Oganov, A. A.; Buryanov, Yal und Shabarova, Z. A. (1984): Interaction of *EcoRII* restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. *EcoRII* endonuclease cleavage of substrates with repeated natural and modified recognition sites, *FEBS Lett.* **167** [1], Seite 147-150. URL: PM:6321233
- [74] Vinogradova, M. V.; Gromova, E. S.; Kosykh, V. G.; Buriyanov, Ial und Shabarova, Z. A. (1990): [Interaction of *EcoRII* restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. Determination of the size of *EcoRII* binding site], *Mol. Biol. (Mosk)* **24** [3], Seite 847-850. URL: PM:2402242
- [75] Soundararajan, M.; Chang, Z.; Morgan, R. D.; Heslop, P. und Connolly, B. A. (2002): DNA binding and recognition by the IIs restriction endonuclease *MboII*, *J. Biol. Chem.* **277** [2], Seite 887-895. URL: PM:11606594
- [76] Rudnick, J. und Bruinsma, R. (1999): DNA-protein cooperative binding through variable-range elastic coupling, *Biophys. J.* **76** [4], Seite 1725-1733. URL: PM:10096873

- [77] Colandene, J. D. und Topal, M. D. (1998): The domain organization of NaeI endonuclease: separation of binding and catalysis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** [7], Seite 3531-3536. URL: PM:9520400
- [78] Karpova, E. A.; Kubareva, E. A. und Shabarova, Z. A. (1999): A model of *EcoRII* restriction endonuclease action: the active complex is most likely formed by one protein subunit and one DNA recognition site, *IUBMB.Life* **48** [1], Seite 91-98. URL: PM:10791921
- [79] Kim, J. J.; Koh, S.; Kim, J. S. und Lee, D. S. (1998): Mode of action on *EcoRI* restriction endonuclease: *EcoRI* and *EcoRI* variant N199H have active monomeric forms., *J.Biochem.Mol.Biol.* **31**, Seite 149-155.
- [80] Christ, F.; Schoettler, S.; Wende, W.; Steuer, S.; Pingoud, A. und Pingoud, V. (1999): The monomeric homing endonuclease PI-SceI has two catalytic centres for cleavage of the two strands of its DNA substrate, *EMBO J.* **18** [24], Seite 6908-6916. URL: PM:10601013
- [81] Li, L.; Wu, L. P. und Chandrasegaran, S. (1992): Functional domains in Fok I restriction endonuclease, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89** [10], Seite 4275-4279. URL: PM:1584761
- [82] Volff, J. N.; Korting, C.; Froschauer, A.; Sweeney, K. und Scharf, M. (2001): Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates, *J.Mol.Evol.* **52** [4], Seite 351-360. URL: PM:11343131
- [83] Daiyasu, H.; Komori, K.; Sakae, S.; Ishino, Y. und Toh, H. (2000): Hjc resolvase is a distantly related member of the type II restriction endonuclease family, *Nucleic Acids Res.* **28** [22], Seite 4540-4543. URL: PM:11071943
- [84] Bujnicki, J. M. (2000): Phylogeny of the restriction endonuclease-like superfamily inferred from comparison of protein structures, *J.Mol.Evol.* **50** [1], Seite 39-44. URL: PM:10654258
- [85] Spiess, E. und Lurz, R. (1988): Electron microscopic analysis of nucleic acids and nucleic-acid protein complexes., *Methods Microbiol.* **20**, Seite 293-323.
- [86] Mucke, M.; Reich, S.; Moncke-Buchner, E.; Reuter, M. und Kruger, D. H. (2001): DNA cleavage by type III restriction-modification enzyme *EcoP15I* is independent of spacer distance between two head to head oriented recognition sites, *J.Mol.Biol.* **312** [4], Seite 687-698. URL: PM:11575924
- [87] Andrade, M. A.; Chacon, P.; Merelo, J. J. und Moran, F. (1993): Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng* **6** [4], Seite 383-390. URL: PM:8332596
- [88] Merelo, J. J.; Andrade, M. A.; Prieto, A. und Moran, F. (1994): Proteinotopic feature maps., *Neurocomputing* **6**, Seite 1-12.
- [89] Schagger, H.; Cramer, W. A. und von Jagow, G. (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis, *Anal.Biochem.* **217** [2], Seite 220-230. URL: PM:8203750
- [90] Schagger, H. und von Jagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal.Biochem.* **199** [2], Seite 223-231. URL: PM:1812789
- [91] Behlke, J.; Ristau, O. und Schonfeld, H. J. (1997): Nucleotide-dependent complex formation between the *Escherichia coli* chaperonins GroEL and GroES studied under equilibrium conditions, *Biochemistry* **36** [17], Seite 5149-5156. URL: PM:9136876

Abkürzungen

A	Adenin	
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	
AU	Absorption Unit (Absorptionseinheit)	
BisTris-HCl	2,2-Bis-(Hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan, mit HCl titriert	
bp	Basenpaar(e)	
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	
C	Cytosin	
Da	Dalton	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DTT	Dithiothreitol	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
G	Guanin	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	
λ	Bakteriophage Lambda, auch Wellenlänge	
kb	Kilobasen	
$K_D/K_{D(app)}$	Dissoziationsgleichgewichtskonstante/scheinbare	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kD/kDa	Kilodalton	
OAc	Acetat-Anion	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PCR	Polymerasekettenreaktion	
PVDF	Polyvinylidendifluorid	
RNA	Ribonukleinsäure	
RP	Reversed Phase	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
T	Thymin	
T3	Bakteriophage T3	
T7	Bakteriophage T7	
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer	
TE	Tris-EDTA	
TFA	Trifluoressigsäure (CF_3COOH)	
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, mit HCl titriert	
U	Unit (Einheit)	
UV	Ultraviolettes Licht	
v/v	Volumenverhältnis einer Mischung aus zwei Flüssigkeiten	
m/v	Masse-Volumen-Verhältnis eines in einer Flüssigkeit zu lösenden Feststoffes	
X	5-Iod-2'-desoxyuridin	
Y	5-Iod-2'-desoxycytidin, auch Tyrosin	

Abbildungsverzeichnis

1.	Kristallstruktur der Restriktionsendonuklease <i>NaeI</i> im Komplex mit spezifischer DNA.	13
2.	Elektronenmikroskopische Darstellung von durch <i>EcoRII</i> induzierten Schleifen in linearer DNA, die zwei DNA-Erkennungssequenzen für <i>EcoRII</i> enthält.	21
3.	DNaseI-Footprint des <i>EcoRII</i> -Wildtyps und der Mutante V258N an einem 282 bp langen DNA-Substrat, das zwei DNA-Erkennungssequenzen für <i>EcoRII</i> enthält.	22
4.	Die scheinbaren Dissoziationskonstanten $K_{D(app)}$ bestimmt durch Gel-Shift-Versuche und die Effizienz der DNA-Spaltung durch <i>EcoRII</i> -Wildtyp und Mutante V258N bestimmt durch die Zeitabhängigkeit der Spaltung.	23
5.	CD-Spektren des <i>EcoRII</i> -Wildtyps und der Mutante V258N.	24
6.	Analyse des oligomeren Status und der molekularen Masse des <i>EcoRII</i> -Wildtyps und der Mutante V258N.	25
7.	Untersuchung der Abhängigkeit der molekularen Masse des <i>EcoRII</i> -Wildtyps und der Mutante V258N von der Proteinkonzentration mittels analytischer Ultrazentrifugation.	27
8.	Spaltung der Plasmid-DNA pKM1 mit einer DNA-Erkennungssequenz durch <i>EcoRII</i> und <i>PspGI</i> .	29
9.	Spaltung der superhelikalen Plasmid-DNA pKM2 mit zwei DNA-Erkennungssequenzen durch <i>EcoRII</i> und <i>PspGI</i> .	30
10.	Gel-Shift-Versuche mit den modifizierten Oligonukleotidduplexen und <i>EcoRII</i> .	32
11.	Spaltung der modifizierten Oligonukleotidduplexe mit <i>EcoRII</i> .	33
12.	Zeitverlauf der photochemischen Vernetzungsreaktion von <i>EcoRII</i> mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotidduplex, dessen 5'C im 5'CCAGG-Strang der DNA-Erkennungssequenz durch Y ersetzt war.	34
13.	Positionen photochemischer Vernetzungen von <i>EcoRII</i> mit Basen innerhalb der DNA-Erkennungssequenz - Vernetzungsmuster.	35
14.	RP-HPLC-Elutionsprofile des vernetzten <i>EcoRII</i> (CL- <i>EcoRII</i>) und des freien <i>EcoRII</i> .	37
15.	Gel-Shift-Versuche mit den Mutanten H36G, H36A und Y41A von <i>EcoRII</i> und einem radioaktiv markiertem 191-bp PCR-Produkt, das eine DNA-Erkennungssequenz für <i>EcoRII</i> enthält.	39

16.	12 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der vernetzten Mutanten und des Wildtyps von <i>EcoRII</i> .	39
17.	Abbau von <i>EcoRII</i> mit Trypsin in Abwesenheit und Gegenwart spezifischer DNA.	40
18.	Abbau von <i>EcoRII</i> mit Chymotrypsin in Abwesenheit und in Anwesenheit spezifischer DNA.	41
19.	Identifikation der proteolytischen Spaltfragmente durch Edman-Sequenzierung.	42
20.	Gel-Shift-Versuche mit <i>EcoRII</i> ⁴⁻¹⁹² und einem 191-bp PCR-Produkt.	44
21.	Kinetik der Spaltung von pBR322 dcm ⁻ DNA mit <i>EcoRII</i> -Wildtyp bzw. <i>EcoRII</i> ¹⁷³⁻⁴⁰⁴ .	45
22.	Spaltung der DNA des Phagen T3 mit <i>EcoRII</i> ¹⁷³⁻⁴⁰⁴ bzw. <i>EcoRII</i> -Wildtyp.	46
23.	Anteil (%) der dimeren Form von <i>EcoRII</i> ⁴⁻¹⁹² bzw. von <i>EcoRII</i> ¹⁷³⁻⁴⁰⁴ an der Gesamtproteinkonzentration (µg/ml).	47
24.	Übersicht zu Domänenstruktur, DNA-bindenden Regionen, funktionellen Aminosäuren und wichtigen Aminosäuresequenzmotiven von <i>EcoRII</i> innerhalb der Primärsequenz.	58
25.	Modell der <i>EcoRII</i> -DNA-Interaktion.	60

Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, durch deren vielfältige Unterstützung und Kooperation diese Arbeit entstehen konnte.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger und Frau Dr. Monika Reuter für die wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft, Anregungen und für die Möglichkeit, das Thema zu bearbeiten, herzlich danken. Herrn Prof. Dr. Rainer Borriss danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Mein ganz besonderer Dank gilt den an der Arbeit beteiligten Kooperationspartnern, die viele anregende Diskussionen ermöglichten, die für mich oft sehr motivierend und lehrreich waren. Herrn Dr. Rudi Lurz und Gerhild Lüder danke ich für die Zusammenarbeit bei der Elektronenmikroskopie. Bei Herrn Dr. Christian Speck möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der DNaseI-Footprints bedanken. Herrn Prof. Dr. Joachim Behlke sei herzlich für seine kontinuierliche Bereitschaft zu analytischen Ultrazentrifugationen gedankt. Frau Dr. Vera Pingoud und Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud danke ich für die Anregung und Ermöglichung der Durchführung der UV-Cross-linking-Experimente in Giessen sowie für interessante Diskussionen. Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Regine Kraft und Gerlinde Grelle für die proteinchemische Analyse des *EcoRII*-DNA-Cross-linking-Produkts und die Sequenzierung der proteolytischen Fragmente von *EcoRII*. Herrn Dr. Virginijus Siksnys und seinen Mitarbeitern bin ich dankbar für das Überlassen der Plasmide pKM1 und pKM2 und für die Möglichkeit, die kinetischen Untersuchungen von *EcoRII* in seinem Labor in Vilnius durchführen zu dürfen.

Ein herzlicher Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern im Labor. Frau Dr. Monika Reuter, Frau Stefanie Reich, Frau Elisabeth Möncke-Buchner, Frau Ursula Scherneck, Frau Petra Mackeldanz, Frau Cordula Petter, Frau Ulrike Marzahn sei für ihre Gesprächsbereitschaft, ihre Ratschläge und Unterstützung sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt. Ein spezielles Dankeschön für Diskussionen und Auflockerung des Arbeitsalltags gilt auch den Damen des Doktorandenzimmers.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern und Geschwistern, die durch großen Einsatz die Arbeit unterstützt und insbesondere auswärtige Laboraufenthalte ermöglicht haben. Gedankt sei auch allen Freunden für Ihre vielfältige Unterstützung und Hilfe.

Eigene Publikationen zum Thema

Artikel

Kunz A, Mackeldanz P, Mücke M, Meisel A, Reuter M, Schroeder C, Krüger DH (1998). Mutual activation of two restriction endonucleases: interaction of *EcoP1* and *EcoP15*. *Biol. Chem.* **379**, 617-620.

Mücke M, Lurz R, Mackeldanz P, Behlke J, Krüger DH, Reuter M (2000). Imaging DNA loops induced by restriction endonuclease *EcoRII*. A single amino acid substitution uncouples target recognition from cooperative DNA interaction and cleavage. *J. Biol. Chem.* **275**, 30631-30637.

Mücke M, Reich S, Möncke-Buchner E, Reuter M, Krüger DH (2001). DNA Cleavage by Type III Restriction-modification Enzyme *EcoP15I* is Independent of Spacer Distance between Two Head to Head Oriented REcognition Sites. *J. Mol. Biol.* **28**, 687-698.

Mücke M, Pingoud V, Grelle G, Kraft R, Krüger DH, Reuter M (2002). Asymmetric photo-cross-linking pattern of restriction endonuclease *EcoRII* to the recognition sequence. *J. Biol. Chem.*, **277**, 14288-14293

Mücke M, Kraft R, Behlke J, Krüger DH, Reuter M. (2002). *EcoRII*: A restriction endonuclease evolving recombinase function? *EMBO J.* **21**, 5262-5268

Möncke-Buchner E, Reich S, Mücke M, Reuter M, Messer W, Wanker EE, Krüger DH. (2002). Counting of CAG repeats in the Huntington's Disease gene in a normal and pathological range by *EcoP15I* cleavage. *Nucleic Acids Res.* **30**, e83

Posterpräsentationen (Abstracts)

Mücke M, Abraham R, Meisel A, Schroeder C, Reuter M, Krüger DH. Close spacing distance does not impair functional interaction between two *EcoP15* DNA recognition sites. 4th New England Biolabs Workshop on Biological DNA modification, Innsbruck-Igls, Österreich, September 1997

Mücke M, Lurz R, Mackeldanz P, Krüger DH, Reuter M. Cooperative DNA binding characteristics of *EcoRII* restriction endonuclease and its mutant V258N analyzed by transmission electron microscopy and DNA footprinting. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Hamburg, September 1999

Mücke M, Lurz R, Mackeldanz P, Behlke J, Krüger DH, Reuter M. Imaging DNA looping by *EcoRII*: A single amino acid substitution uncouples target recognition from cooperative DNA interaction and cleavage. 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, Juli 2000

Mücke M, Pingoud V, Kraft R, Krüger DH, Reuter M. Asymmetric photo-cross-linking pattern of restriction endonuclease *EcoRII* to the DNA recognition sequence. 19th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Lissabon, Juli 2001

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation „BESONDERHEITEN DER DNA-ERKENNUNG UND SPALTUNG DURCH DIE RESTRIKTIONSENDONUKLEASE *EcoRII*“ selbst verfaßt habe und auch in Teilen keine fremden Arbeiten darin enthalten sind. Teile dieser Arbeit waren bzw. werden Gegenstand eigener Publikationen. Die verwendeten Hilfsmittel und Literatur habe ich vollständig angegeben.

Berlin, April 2002

Merlind Mücke